



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Génie des Procédés et de l'Environnement

Présentée et soutenue par :

Mme SANDRA DEBUY

le jeudi 8 janvier 2015

Titre :

DEVELOPPEMENT DE CATHODES MICROBIENNES CATALYSANT LA
REDUCTION DU DIOXYGENE

Ecole doctorale :

Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés (MEGeP)

Unité de recherche :

Laboratoire de Génie Chimique (L.G.C.)

Directeur(s) de Thèse :

M. ALAIN BERGEL

M. BENJAMIN ERABLE

Rapporteurs :

M. FREDERIC JORAND, UNIVERSITE DE LORRAINE

Mme WAFA ACHOUAK, CEA CADARACHE

Membre(s) du jury :

M. ROMAIN BRIANDET, INRA JOUY EN JOSAS, Président

M. ALAIN BERGEL, INP TOULOUSE, Membre

M. BENJAMIN ERABLE, CNRS TOULOUSE, Membre

M. JEAN-CHRISTOPHE PIARD, INRA JOUY EN JOSAS, Membre

Remerciements

J'adresse mes remerciements à Benjamin Erable, de m'avoir confié ce sujet et d'avoir accepté de diriger ce travail. Je le remercie également pour sa contribution à ce travail, notamment pour l'aide qu'il m'a apporté dans la rédaction de ce mémoire. Merci.

Je tiens également à remercier Alain Bergel qui a participé à l'encadrement de ces travaux. Merci pour ton encouragement et ton soutien lors de la rédaction de publication.

Merci également à tous les membres du jury qui ont apporté un œil critique et constructif sur mes travaux :

Je remercie sincèrement les rapporteurs Frédéric Jorand et Wafa Achouak pour avoir donné de leur temps afin d'assurer la lourde tâche de juger ce manuscrit.

Egalement un grand merci à Romain Briandet, président du jury, et Jean-Christophe Piard d'avoir bien voulu porter leur attention à mon travail, d'avoir participé au jury de thèse et surtout de m'avoir si bien accueilli dans leur équipe lors de ces deux semaines de travail intensif à Massy.

Au cours des deux semaines que j'ai passées à l'Institut MICALIS de Massy, j'ai été particulièrement bien intégrée dans l'équipe, où j'ai trouvé une ambiance agréable auprès de personnes que j'ai pris plaisir à côtoyer et qui ont permis que mes travaux se fassent dans les meilleures conditions. Je les en remercie. Je remercie particulièrement Leila pour toute l'aide (et elle est immense) qu'elle m'a apportée lors des manipulations, Priscilla pour son sourire et les journées entre filles ; Julien pour les magnifiques images de microscopies que tu as réalisées et Thierry pour sa patience lorsqu'il attendait que je daigne enfin sortir du laboratoire pour fermer les portes de l'Institut.

J'exprime mes sincères et chaleureux remerciements à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer et apprécier durant ces trois courtes et longues (cela dépend de l'humeur du moment) années de thèse au LGC :

Je remercie toute l'équipe « Biofilms électroactifs »; Régine pour sa bonne humeur, sa gentillesse et son soutien lors de la période critique de la rédaction ; Marie-Line pour son enthousiasme sans faille et Luc (non, les fiches sécurité des produits chimiques ne sont pas obligatoires dans le manuscrit !).

Je remercie l'aide et la disponibilité de toute l'équipe du site de la Faculté de Pharmacie du LGC et notamment Christine Roques et Sophie Pécastaings qui ont contribué par leur chaleureux accueil, des manipulations, des mises à disposition de matériel, ou juste des conseils à la réussite de ces travaux.

Je tiens également à remercier trois magnifiques femmes du laboratoire LGC, Jocelyne, Claudine et Danielle pour leur aide administrative.

J'adresse une pensée spéciale aux doctorantes et doctorants qui forment une équipe solidaire au sein du laboratoire et qui constitue une grande source d'encouragement et de motivation : mention spéciale pour Coline, ma camarade de ces trois ans qui m'a soutenue et

Remerciements

encouragée ; Raphaël, Diana et Claudia, qui font partie des anciens ; Ingrid, Célestine, Manon, Mylène, Freddy, Elise qui vont (très) vite devenir docteurs à leur tour et Paul, le p'tit nouveau. J'ai également une pensée pour les « non-doctorants »: Mickael, Huberson, Marjorie, Lorena, Yan, Amandine (la grande), Amandine (la petite !) et Vincent (la salle de sport m'a paru triste et ennuyeuse sans toi !).

Pour finir, je souhaite remercier pour leur soutien indéfectible même si la distance qui nous sépare est difficile (selon Mappy Nancy est à 947 Km en 8h37 pour le trajet le plus rapide, 834 Km en 12h30 pour le trajet le plus court, de Toulouse), tous les membres de ma famille. Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de rencontrer un magnifique spécimen d'électron, un électron libre et mystérieux ! Le courant est plutôt bien passé entre nous. Un grand merci à toi, point.

Sommaire

Introduction générale.....	3
-----------------------------------	----------

Chapitre I.....	
------------------------	--

Synthèse bibliographique	7
---------------------------------------	----------

I.1) Biofilms électroactifs.....	9
I.1.1) Biofilms	9
I.1.1.a) Définition	9
I.1.1.b) Mécanismes de formation d'un biofilm.....	9
Conditionnement de la surface par le milieu.....	10
Transport des bactéries vers le support	10
Adhésion des bactéries	11
Maturation du biofilm	11
Détachement des cellules bactériennes	11
I.1.1.c) Particularités de la vie en biofilm	11
I.1.2) Biofilms électroactifs.....	12
I.2.2.a) Biofilms électroactifs : historique et définition	12
I.2.2.b) Biofilms électroactifs formés en milieu marin	12
I.1.3) Mécanismes de transfert d'électrons chez les microorganismes électroactifs	13
I.1.3.a) Mécanismes de transfert indirects.....	13
Oxydation à l'anode d'un produit du métabolisme bactérien	13
Transfert électronique par des médiateurs artificiels	14
Transfert électronique par des médiateurs produits par les microorganismes	14
I.1.3.b) Mécanismes de transfert directs	15
Transfert via des protéines membranaires.....	15
Transfert via des pili conducteurs	16
I.1.3.c) Bilan des mécanismes de transfert d'électrons	17
I.1.4) Maîtrise et optimisation de la formation des biofilms électroactifs	21
I.1.4.a) L'inoculum.....	21
I.1.4.b) Le substrat.....	21
I.1.4.c) L'électrolyte.....	21
I.1.4.d) L'électrode.....	22
I.2.) Biocathodes	23
I.2.1) Généralités	23
I.2.1.a) Bioremédiation.....	25
I.2.1.b) Electrosynthèse microbienne	25

I.2.2) Biocathodes anaérobies	26
I.2.3) Biocathodes aérobies	27
I.2.3.a) Bilan des travaux sur les biocathodes aérobies.....	27
I.2.3.b) Limitations des biocathodes aérobies	31
pH.....	31
Transfert du dioxygène.....	31
Sensibilité des microorganismes aux espèces réactives de l'oxygène	31
Salissures de la surface cathodique	32
I.3) Catalyse électromicrobienne de la réaction de réduction du dioxygène sur acier inoxydable en milieu marin.....	32
I.3.1) Historique	32
I.3.2) Acier inoxydable et dioxygène	33
I.3.2.a) Acier inoxydable.....	33
I.3.2.b) Le dioxygène et sa réduction sur acier inoxydable.....	33
I.3.3) Possibles mécanismes de la réduction du dioxygène par les microorganismes	34
I.3.3.a) Catalyse directe par les enzymes sécrétées par les bactéries	35
I.3.3.b) Catalyse directe par des porphyrines piégées dans le biofilm	36
I.3.3.c) Catalyse indirecte médiée par le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries.....	36
I.3.3.d) Catalyse indirecte médiée par le manganèse ou les oxydes de fer	36
I.3.3.e) Modification des propriétés catalytiques des oxydes de fer par les biofilms marins.....	37
I.3.3.f) Transfert d'électrons directement de la cathode aux microorganismes	37
I.3.4) Caractérisation des biofilms marins	38
I.3.4.a) Caractérisation microscopique des biofilms marins sur acier par microscopie en épifluorescence	38
I.3.4.b) Caractérisation de la diversité microbienne.....	40
Méthodes de caractérisation de la diversité microbienne.....	40
Bilan des analyses de la diversité	41
I.4) <i>Lactococcus lactis</i> : bactérie électroactive à coloration de Gram positive.....	44
I.4.1) <i>Lactococcus lactis</i> : un modèle de bactérie lactique.....	45
I.4.1.a) <i>Lactococcus lactis</i> : métabolisme des sucres par fermentation	45
Métabolisme du glucose : la glycolyse	45
En aval du pyruvate : métabolisme homolactique ou métabolisme mixte.....	45
Régulation du métabolisme des sucres.....	47
I.4.1.b) <i>Lactococcus lactis</i> : métabolisme aérobie	47
Métabolisme aérobie	47
Stress oxydant	47

Respiration	48
I.4.2) <i>Lactococcus lactis</i> : formation de biofilm	48
I.4.3) Propriétés électrochimiques de <i>Lactococcus lactis</i>	49
I.4.3.a) Propriétés électrochimiques des bactéries à coloration de Gram positive	49
I.4.3.b) Propriétés électrochimiques de <i>Lactococcus lactis</i>	50
 Chapitre II	
Matériel et Méthodes	53
 II.1) Réacteurs bioélectrochimiques à trois électrodes	55
II.1.1) Les électrodes	55
II.1.1.a) L'électrode de référence	55
II.1.1.b) La contre électrode	56
II.1.1.c) Les électrodes de travail	56
L'acier inoxydable 254SMO et traitements	57
Le tissu de carbone	57
II.1.2) Les techniques électrochimiques	57
II.1.2.a) La chronoampérométrie	58
II.1.2.b) La voltammétrie cyclique	58
II.1.2.c) La voltammétrie à impulsion différentielle	59
II.2) Etude de bactéries marines	61
II.2.1) Milieux de culture des bactéries marines	61
II.2.1.a) Eau de mer naturelle	61
II.2.1.b) Eau de mer synthétique	61
II.2.1.c) Milieu Marine Broth et Marine Agar	63
II.2.2) <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	64
II.2.2.a) Cinétique de croissance et de production de caroténoïdes	64
II.2.2.b) Transformation d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	64
Préculture	64
Préparation des cellules compétentes	64
Electroporation et sélection des transformants	64
II.2.2.c) Tests de colonisation d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	65
Coupons : matériaux et traitements	65
Dispositif expérimental	66
Préparation des échantillons	67
Observation microscopique	67

Dénombrement	67
II.2.2.e) Tests électrochimiques d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	67
II.2.3) Bactéries marines	68
II.2.3.a) Formation du biofilm marin	68
II.2.3.b) Diversité microbienne	69
Extraction génomique	69
Amplification (PCR universelle)	70
Pyroséquençage	70
II.2.3.c) Isolement des bactéries hétérotrophes	72
II.2.3.d) Identification des isolats bactériens	72
II.2.3.e) Tests électrochimiques avec les isolats bactériens	72
II.3) Etude de <i>Lactococcus lactis</i>	73
II.3.1) Milieux de culture de <i>Lactococcus lactis</i>	73
II.3.1.a) Milieu « Resting Cell »	73
II.3.1.b) Milieu MCD Lactocoque	73
II.3.1.c) Milieu M17 Broth	75
II.3.2) Transformation de <i>Lactococcus lactis</i>	75
II.3.2.a) Préculture	75
II.3.2.b) Préparation des cellules compétentes	76
II.3.2.c) Extraction plasmidique, digestion et migration sur gel	76
II.3.2.d) Electroporation, sélection des transformants et vérification de l'insertion plasmidique	76
II.3.3) Tests de colonisation de <i>Lactococcus lactis</i>	77
II.3.3.a) Préparation des échantillons	77
II.3.3.b) Appareillage	77
II.3.3.c) Observation et analyse de la colonisation	77
II.3.4) Tests électrochimiques de <i>Lactococcus lactis</i>	77

Chapitre III.....

Compréhension et optimisation d'une biocathode « modèle » de réduction du dioxygène.

Focus sur les biofilms d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur des électrodes en acier inoxydable79

III.1) Contexte et objectifs de travail	81
III.1.1) Historique et bilan des travaux concernant les biocathodes aérobies au LGC	81
III.1.2) Objectifs de travail	83
III.2) Croissance d' <i>Algoriphagus</i> et production de caroténoïdes	83

III.2.1) Effet de la température et du milieu sur la croissance d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	84
III.2.2) Cinétique et optimisation de production de caroténoïdes	87
III.3) Optimisation de la colonisation de l'acier inoxydable par <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> .	90
III.3.1) Transformation d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	90
III.3.2) Mise en place et développement d'un test de colonisation.....	92
III.4) Propriétés électroactives d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	97
III.4.1) Test 1.....	98
III.4.2) Test 2.....	99
III.4.3) Test 3.....	100
III.4.4) Test 4.....	102
III.4.5) Test 5.....	102
III.4.6) Test 6.....	102
III.4.7) Test 7.....	103
III.4.8) Conclusions sur les essais électrochimiques.....	103
III.5) Conclusions sur ce chapitre et perspectives.....	103

Chapitre IV

Recherche de nouveaux isolats bactériens marins électroactifs..... 105

IV.1) Formation d'un nouveau biofilm marin aérobique dit « sauvage » et présentation de la démarche expérimentale envisagée pour isoler de nouvelles souches modèles.....	107
IV.2) Analyse de la diversité bactérienne d'un biofilm cathodique formé en eau de mer par pyroséquençage	108
IV.3) Isolement des nouvelles souches marines et identification	111
IV.3.1) Isolement des souches sur milieux gélosés.....	111
IV.3.2) Positionnement des isolats bactériens par rapport à la diversité microbienne du biofilm marin « sauvage ».....	114
IV.4) Tests électrochimiques avec les isolats bactériens	115
IV.4.1) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,2V/ECS.....	115
IV.4.2) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,2 puis - 0,3V/ECS.....	116
IV.4.3) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,3 V/ECS....	121
IV.4.4) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,3 V/ECS....	122
IV.4.5) Tests réalisés en eau de mer synthétique stérilisée par autoclavage, potentiel imposé - 0,3 V/ECS.....	123
IV.4.6) Bilan des tests électrochimiques réalisés avec les nouveaux isolats bactériens	125

IV.4.7) <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> : tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée et synthétique stérilisée par autoclavage, potentiel imposé - 0,3 V/ECS.....	126
IV.4.8) Conclusions.....	127
IV.5) Conclusions sur ce chapitre et perspectives.....	128
Chapitre V.....	
Capacités électroactives de <i>Lactococcus lactis</i>	
Mise en évidence d'une catalyse de réduction du dioxygène.....	129
V.1) Contexte et objectifs de travail.....	131
V.1.1) Contexte	131
V.1.2) Objectifs de travail	131
V.2) Tests de colonisation.....	132
V.2.1) Transformation de <i>Lactococcus lactis</i>	132
V.2.2) Tests de colonisation en microplaques avec la souche « pil + ».....	135
V.2.2.a) Influence du tampon MOPS sur la formation de biofilm de <i>Lactococcus lactis</i>	136
V.2.2.b) Influence du NaCl sur la formation de biofilm de <i>Lactococcus lactis</i>	137
V.2.2.c) Influence de l'hémine sur la formation de biofilm de <i>Lactococcus lactis</i> ...	139
V.2.3) Tests de colonisation en microplaques : souche « pil + » vs « pil – »	140
V.2.4) Recherche de conditions expérimentales favorisant la fluorescence de la protéine Gfp.....	141
V.2.4.a) Stabilisation du pH en cellule à flux continu	142
V.2.4.b) Influence de la concentration en antibiotique assurant la pression de sélection, la tétracycline	142
V.3) Tests électrochimiques.....	144
V.3.1) Choix du milieu.....	144
V.3.1.a) Milieu Resting Cell	144
V.3.1.b) Milieu M17	145
V.3.1.c) Milieu MCD	146
V.3.2) Influence du pH et des pili sur les performances électrochimiques en milieu MCD	149
V.3.3) Recherche des mécanismes de transfert d'électrons	151
V.3.3.a) Modèle de transfert d'électrons lors de l'oxydation du glucose par <i>Lactococcus lactis</i>	155
V.3.3.b) Modèle de transfert d'électrons lors de la réduction du dioxygène par <i>Lactococcus lactis</i>	156
V.4) Conclusions sur le chapitre et perspectives.....	157

Conclusion générale & Perspectives	159
Table des illustrations	163
Références bibliographiques	173
Annexes	201

Introduction générale

Contexte et problématique

Pendant longtemps les bactéries ont été étudiées sous forme planctonique, alors que dans la nature, la majorité d'entre elles se trouve sous forme sessile, c'est-à-dire adhérentes à des surfaces et organisées en biofilms. Habituellement, les biofilms sont dénoncés pour les contraintes qu'ils occasionnent à l'image des modifications de surfaces qu'ils entraînent parfois dans les installations industrielles, maritimes et leurs contributions significatives dans la biodétérioration des matériaux, etc.

Néanmoins, par certaines de leurs propriétés, le rôle des biofilms peut parfois être détourné pour être valorisé dans des bioprocédés. C'est typiquement le cas des biofilms électroactifs initialement décrits à la fin des années 90 comme des agents microbiens moteurs des phénomènes de corrosion (biocorrosion). Plusieurs travaux, notamment avec des biofilms de SRB (*sulfate reducing bacteria*) ont en effet montré que des bactéries formant des biofilms à la surface de matériaux conducteurs sont capables d'échanger des électrons avec cette surface et catalyser des réactions électrochimiques. Les propriétés de ces biofilms que l'on a qualifiés d'électroactifs ont été rapidement exploitées pour développer des procédés bioélectrochimiques dont la pile microbienne est l'exemple le plus connu. Dans une pile microbienne, les microorganismes sont ainsi capables de transférer des électrons issus de leur métabolisme à une électrode (anode) ou d'utiliser directement une électrode comme source d'électrons pour leur développement (cathode).

Les travaux sur la thématique de la pile microbienne sont en plein essor depuis le début des années 2000. Rien que sur l'année 2014, il y a plus de 1600 références répertoriées sur Google ScholarTM. La plupart des piles microbiennes décrites dans la littérature mettent en œuvre une catalyse électromicrobienne sur l'anode. Les cathodes sont bien souvent abiotiques et fonctionnent grâce à la catalyse de la réduction du dioxygène par du platine supporté sur des électrodes de carbone. Toutefois, le platine, catalyseur nécessaire pour que les réactions électrochimiques aient lieu, est rare et donc très coûteux. Aussi, ses performances restent limitées dans la gamme de pH dans laquelle fonctionnent les piles microbiennes ($6 < \text{pH} < 8$). Il existe un bon nombre de projets visant à développer des catalyseurs alternatifs pour remplacer le platine sur les cathodes des piles microbiennes. Parmi d'autres, on peut citer les recherches menées autour des métaux non nobles, des enzymes, ou des systèmes bio-inspirés comme les porphyrines de cobalt ou de fer. Une autre possibilité est l'utilisation de microorganismes électroactifs, capables d'échanger des électrons avec une électrode, pour remplacer le platine. En effet, certains microorganismes électroactifs et plus particulièrement certaines bactéries aérobies sont de très bons catalyseurs électrochimiques de la réduction du dioxygène lorsqu'ils sont adhérents sous forme de biofilms sur la surface d'une électrode. On parle alors de biocathodes aérobies ou de cathodes microbiennes aérobies pour qualifier ces systèmes de cathodes à biofilms capables de réduire le dioxygène.

La recherche autour de ces biocathodes aérobies est un des axes de recherche historique et stratégique de l'équipe « Ingénierie des biofilms » du Laboratoire de Génie Chimique. C'est d'ailleurs cette même équipe qui a décrit pour la 1^{ère} fois en 2005 le concept de biofilm électroactif capable de catalyser la réduction du dioxygène (Bergel et al., 2005). Plus précisément, elle a mis au point une cathode microbienne réduisant le dioxygène à partir d'une électrode en acier inoxydable recouverte d'un biofilm marin aérobie. Par la suite et souvent en collaboration avec le CNR ISMAR de Gênes en Italie, plusieurs générations de biocathodes ont été formées avec des électrodes en acier inoxydable directement exposées à un environnement marin ouvert. Les biofilms électroactifs aérobies se forment naturellement en quelques jours dans de l'eau de mer naturelle en système ouvert (Dumas et al., 2008) ou bien dans un système fermé continuellement renouvelé en eau de mer naturelle (Erable et al.,

2010). En eau de mer naturelle, la composition des populations bactériennes qui forment les biofilms n'est pas du tout maîtrisable. La composition détaillée et réelle de l'eau de mer est également mal connue et surtout très instable en fonction de l'espace et du temps. Tous ces facteurs, sans cesse variables, rendent difficiles l'étude des mécanismes de transfert d'électrons mis en jeu entre le matériau de la cathode et les bactéries électroactives qui composent le biofilm.

Objectifs et stratégies de la thèse

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503) dans le cadre du projet ANR « BioCathInox ».

L'objectif premier de la thèse vise d'abord à maîtriser le développement de biofilms électroactifs aérobies monospèces catalysant efficacement la réduction du dioxygène sur des électrodes en acier inoxydable dans des conditions de laboratoire, c'est-à-dire dans des réacteurs bioélectrochimiques fermés où tous les paramètres expérimentaux sont parfaitement bien maîtrisés.

Le deuxième objectif est d'utiliser ces interfaces biofilms monospèces / électrode dans des conditions maîtrisées et surtout reproductibles afin de progresser dans la compréhension des mécanismes de transfert électronique qui ont lieu lors de la catalyse électromicrobienne.

Plusieurs stratégies ont été mises en place afin de pouvoir réaliser ces objectifs.

Une de ces stratégies est de mettre en place une démarche expérimentale qui doit nous permettre d'isoler des microorganismes électroactifs à partir de la fraction cultivable d'un biofilm marin aérobic formé en milieu marin ouvert. En effet, la caractérisation des populations bactériennes au sein des biofilms marins capables de catalyser la réduction du dioxygène soit par des techniques microbiologiques et/ou soit par des méthodes de biologie moléculaire à montrer que ces biofilms renfermaient une diversité, en matière d'espèces microbiennes, très riche. Or, la majorité des souches bactériennes identifiées sont soupçonnées de ne pas intervenir directement dans le mécanisme d'échange électronique avec l'électrode. De plus, une grande partie de la population microbienne composant le biofilm marin n'est pas cultivable et ne peut donc pas devenir un modèle d'étude pour la formation de biocathodes en laboratoire. Le seul moyen pour isoler une ou plusieurs espèces bactériennes pouvant nous servir de modèle d'étude pour la suite des travaux est de viser la partie cultivable des espèces du biofilm.

La seconde stratégie est de définir la composition d'un milieu synthétique permettant aux bactéries électroactives d'exprimer leurs propriétés électroactives de façon optimale. Les microorganismes identifiés dans les biofilms marins sont majoritairement des bactéries hétérotrophes oxydant des substrats organiques. Il est supposé que certains de ces microorganismes sont capables de moduler leur métabolisme et d'utiliser une électrode comme donneur d'électrons lorsque les conditions environnementales deviennent trop restrictives en substrats organiques. Par exemple, il a été démontré que des bactéries électroactives pouvaient perdre leurs propriétés électroactives lorsqu'elles étaient cultivées dans un milieu riche en composés organiques. Le milieu synthétique devra donc être à base d'eau de mer synthétique supplémentée avec des quantités minimales de carbones, vitamines et micronutriments permettant d'assurer un développement du biofilm bactérien et une expression maîtrisée du caractère électroactif.

La dernière stratégie consiste à élargir les possibilités d'application des biocathodes aérobies en identifiant de nouveaux environnements renfermant des espèces électroactives capables de

catalyser la réduction du dioxygène. Les principaux exemples de microorganismes catalysant la réaction de réduction du dioxygène au contact d'une électrode ont principalement été décrits en milieux marins. Mais quelques études ont cependant permis de mettre en évidence des mécanismes similaires chez des microorganismes récupérés dans des effluents de stations d'épuration. Or, ces milieux sont connus pour être riches en matières organiques facilement oxydables, ce qui laisserait à penser que d'autres microorganismes, plus conventionnels, pourraient également utiliser une électrode comme donneur d'électrons en présence de concentrations plus conséquentes en matière organique. Ainsi, nous verrons comment, dans le cadre d'une collaboration avec l'institut MICALIS (Massy, France), des tests électrochimiques ont été entrepris avec une souche bactérienne *Lactococcus lactis*, issue de l'industrie agroalimentaire.

Organisation du manuscrit

Ce mémoire de thèse est organisé en 5 chapitres.

Le chapitre I est une synthèse bibliographique. La première partie du chapitre est une introduction aux notions de base sur les biofilms électroactifs dans laquelle les mécanismes connus de transfert d'électrons sont clairement détaillés. La seconde partie présentera une description générale des biocathodes. Puis l'accent sera porté plus particulièrement sur la catalyse électromicrobienne de la réduction du dioxygène dans une troisième partie. Enfin une dernière partie est consacrée à *Lactococcus lactis*.

Le chapitre II présente les dispositifs expérimentaux, les méthodes et les techniques électrochimiques utilisés ainsi que les protocoles appliqués pour l'étude de la colonisation des supports métalliques ou non et pour l'analyse des communautés bactériennes des biofilms.

Le chapitre III présente les résultats issus des travaux menés avec un isolat bactérien électroactif modèle, *Algoriphagus yeomjeoni*, isolé à partir d'un biofilm marin aérobie au cours d'une étude antérieure à cette thèse (collaboration avec le LEMiRE). La première partie s'intéresse à la croissance de cette souche ainsi qu'à sa propre production de métabolites d'intérêt électrochimique, les caroténoïdes. La seconde partie met l'accent sur l'amélioration de la colonisation de l'acier inoxydable par cette même souche. La dernière partie est dédiée à l'étude des propriétés électroactives de cette souche modèle en milieu synthétique.

Le chapitre IV donne dans une première partie la description détaillée des populations bactériennes composant un biofilm électroactif formé en milieu marin naturel. Les résultats de la méthode conduisant à l'isolement de nouvelles souches hétérotrophes ont été discutés dans une seconde partie. Et enfin, la troisième et dernière partie se consacre à l'étude des propriétés électroactives de ces souches bactériennes nouvellement isolées.

Le chapitre V porte sur la recherche d'une activité électroactive spécifique chez une souche bactérienne ne provenant pas d'un environnement naturel comme l'eau de mer mais plutôt d'un milieu industriel *Lactococcus lactis*. Ce chapitre est découpé en deux parties. La première fait état des conséquences de plusieurs paramètres sur la formation de biofilm à partir de la souche *Lactococcus lactis*. L'autre partie est axée sur l'étude des propriétés électroactives récemment découvertes chez cette souche.

Des conclusions partielles jalonnent chacun de ces chapitres et seront utilisées dans la conclusion générale de ce travail de thèse et comme bases à la proposition de nouvelles perspectives de recherche.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1) Biofilms électroactifs

I.1.1) Biofilms

I.1.1.a) Définition

Le terme « biofilm » a été proposé pour la première fois en 1978 pour suggérer que le mode de vie des microorganismes attachés à une surface serait le mode de vie naturel de la plupart des microorganismes dans des systèmes aqueux (Costerton et al., 1978). Quelques années plus tard, il a été admis que dans l'environnement naturel, la majorité des bactéries se présentent sous de forme biofilm (Costerton et al., 1995; Davey & O'toole, 2000).

Les bactéries associées à une surface sont assimilées à des communautés microbiennes sessiles contrairement aux bactéries libres en suspensions appelées cellules planctoniques. Les microorganismes peuvent également former des biofilms à l'interface air/liquide. De même, les floes (ou agrégats) sont aussi considérés comme des biofilms (Figure I-1).

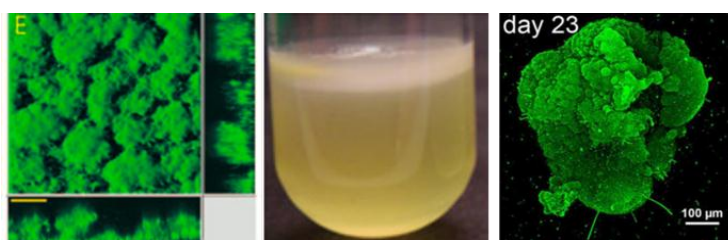


Figure I-1 : Biofilms de (A) *Shewanella oneidensis* sur une surface en verre (Thormann et al., 2004) ; (B) *Pseudomonas aeruginosa* à l'interface air/liquide (Bartlett et al., 2011) et un floc de boue activée (C) (Weissbrodt et al., 2013).

Aujourd'hui, « un biofilm bactérien est défini comme étant un assemblage de cellules bactériennes attachées irréversiblement à un support ou à une interface, enveloppées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires produites par les bactéries elles-mêmes, et qui présentent un phénotype différent de celui des bactéries planctoniques, au niveau du taux de croissance et de la transcription des gènes » (Donlan & Costerton, 2002).

I.1.1.b) Mécanismes de formation d'un biofilm

La littérature contient actuellement un grand nombre de publications décrivant comment les microorganismes s'organisent pour former un biofilm (Pratt & Kolter, 1998; Filloux & Vallet, 2003; Hall-Stoodley et al., 2004; Kolter & Greenberg, 2006). La formation d'un biofilm bactérien sur une surface est un phénomène faisant intervenir différents processus, aussi bien biologiques que physico-chimiques (Stoodley et al., 2002).

Comme le montre la Figure I-2, la formation d'un biofilm se déroule en 5 étapes.

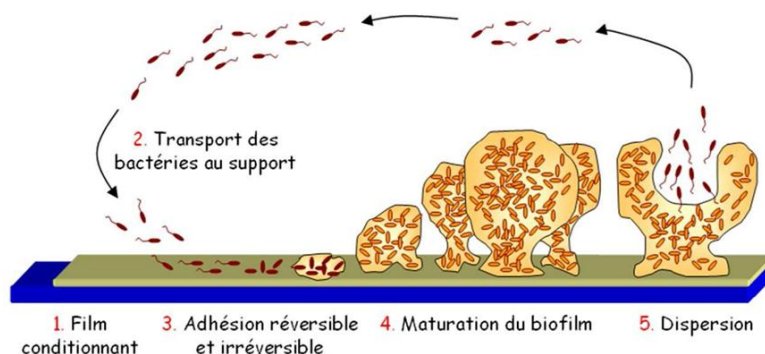


Figure I-2 : Représentation schématique du cycle de vie d'un biofilm. (d'après Salauen et al., 2012)

Conditionnement de la surface par le milieu

La première étape du processus de formation d'un biofilm est l'apparition d'un « film conditionnant » à la surface du support. Cela consiste en l'adsorption spontanée de molécules organiques (acides humiques, polysaccharides, protéines) et d'ions en surface du support dès ses premières secondes d'immersion en milieu aqueux (Little & Jacobus, 1985). Ce film varie donc en fonction de la nature du milieu ainsi que des caractéristiques de surface du matériau support. Le phénomène de conditionnement de la surface peut être assimilé à une salissure moléculaire du support qui va altérer les propriétés de surface initiales du matériau et ainsi inhiber ou favoriser la colonisation du support par les microorganismes (Schneider et al., 1994; Pasmore & Costerton, 2003; Qian et al., 2007).

Transport des bactéries vers le support

Selon divers facteurs environnementaux, la nature (force ionique et viscosité) et le mouvement (écoulement, flux, sédimentation) du milieu aqueux, les bactéries planctoniques vont être plus ou moins attirées vers le support. Deux types d'approches des bactéries vers le support existent. L'approche de type passive est fonction de l'environnement dans lequel évoluent les microorganismes. La colonisation du support est amorcée par gravitation, diffusion ou force de projection d'un flux turbulent (Donlan & Costerton, 2002). Et, l'approche de type active fait référence à la mobilité intrinsèque des bactéries (Thomas et al., 2002). Les moyens de locomotion autonome des cellules bactériennes planctoniques sont généralement les flagelles et les pili (Figure I-3).

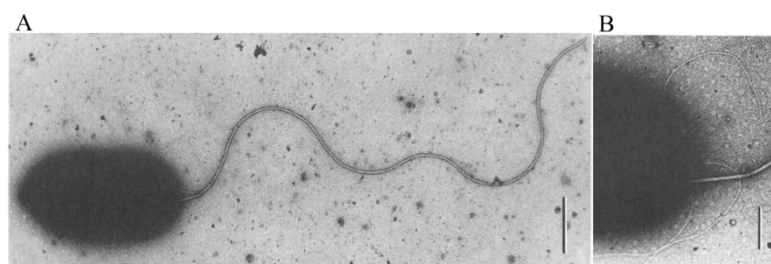


Figure I-3 : Flagelle (A) et pili (B) de *Thiobacillus ferrooxidans* (Dispirito et al., 1982).

Adhésion des bactéries

La troisième étape dans la formation du biofilm est l'adhésion. Celle-ci intervient quelques heures après l'immersion du support dans le milieu aqueux. Cette adhésion, mettant en scène trois acteurs : « support-milieu-bactérie », se déroule en deux étapes :

L'adhésion réversible

Cette première adhésion est dite « réversible » car, à ce stade de la formation du biofilm, les liaisons entre les bactéries et le support sont fragiles, donnant la possibilité à ce premier contact d'être transitoire. Ces liaisons sont de type électrostatique, van der Waals ou acide-base de Lewis et font intervenir des macromolécules de surface, telles que des protéines, des polysaccharides et lipopolysaccharides (LPS) (DeFlaun et al., 1999) ; et des appendices de surface tels que des flagelles (O'Toole & Kolter, 1998; Vallet et al., 2001) et des pili (Pratt & Kolter, 1998).

L'adhésion irréversible

Le passage du statut « réversible » à celui d'« irréversible » est rendu possible par la sécrétion bactérienne de polymères extracellulaires (EPS) formant des ponts de fixation entre la cellule et le support. Ces ponts de fixation se créent vers des zones où les molécules de surface de la bactérie ainsi que celles du support sont capables de se lier covalamment par des interactions fortes de type hydrophobe.

Maturation du biofilm

La maturation du biofilm correspond à la multiplication cellulaire permettant l'accroissement des colonies formées en surface du support. Les conditions environnementales telles que la source de carbone ou le flux hydrodynamique vont avoir un impact sur la structuration du biofilm (Stanley et al., 2003; Klausen et al., 2006). De même, les facteurs génétiques déterminant les réponses aux signaux environnementaux influencent la structure du biofilm (Johnson, 2008). Durant la maturation, se forme généralement un film tridimensionnel hétérogène constitué de canaux où circule le flux du milieu permettant la circulation de nutriments et du dioxygène (Costerton et al., 1999; Donlan, 2002).

Détachement des cellules bactériennes

Cette dernière étape du cycle de vie du biofilm peut être induite par le vieillissement du biofilm. Mais, ce détachement peut se produire tout au long de la formation du biofilm lorsque survient un stress. En effet, les conditions environnementales peuvent devenir défavorables : carence nutritive, limitation de la disponibilité en accepteurs d'électrons, modification du pH (Sauer et al., 2004). La dispersion est aussi due aux forces physiques appliquées sur le biofilm, telles que l'érosion (détachement continu de cellules individuelles), le relargage (perte rapide et massive du biofilm) ou l'abrasion (détachement dû à la collision de particules du milieu avec le biofilm) (McDougald et al., 2012). Les bactéries ainsi libérées vont pouvoir coloniser de nouvelles surfaces (Parsek & Greenberg, 2005).

I.1.1.c) Particularités de la vie en biofilm

La vie en biofilm est une vie en communauté. Cette niche écologique offre divers avantages. L'avantage principal est la protection des bactéries contre des conditions environnementales défavorables. En effet, de par sa structure et son épaisseur le biofilm crée une barrière de

diffusion (De Beer et al., 1994). Les bactéries en surface du biofilm sont les plus exposées aux fluctuations du milieu environnant et notamment aux agents antimicrobiens. La vie en biofilm contribue à la diversité génétique. La proximité des microorganismes favorise les transferts de gènes entre eux, c'est ce qu'on appelle le transfert horizontal de gènes. Dans des échantillons de sol, un transfert de gènes pour une résistance aux métaux lourds a été démontré entre *Escherichia coli* et *Alcaligenes eutrophus* (Top et al., 1990). Le biofilm permet également l'accès aux ressources telles que les nutriments qui circulent dans le biofilm et qui sont concentrés dans la matrice de polymères extracellulaires (EPS) (Costerton et al., 1981; Branda et al., 2005).

I.1.2) Biofilms électroactifs

I.2.2.a) Biofilms électroactifs : historique et définition

Une force électromotrice dans une pile est obtenue pour la première fois entre des électrodes immergées dans une suspension de bactéries/levures et des électrodes immergées en milieu stérile, en 1911 (Potter, 1911). Potter émet l'hypothèse que l'énergie électrique obtenue proviendrait de la dégradation de la matière organique par les microorganismes. Celle-ci sera confirmée 20 ans plus tard par Barnett Cohen par la réalisation d'une pile microbienne délivrant 35 V pour 0,2 mA (Cohen, 1931). A partir des années 2000, dans un contexte où de nouvelles sources d'énergie alternatives sont recherchées, la recherche dans le domaine de production d'énergie par les microorganismes est en plein essor. Actuellement, les bactéries électroactives sont définies comme des microorganismes capables d'échanger des électrons avec une surface solide. Ces échanges d'électrons peuvent générer un courant électrique. Par exemple, il est possible d'extraire de l'énergie électrique directement en exploitant les processus biologiques des bactéries marines (Reimers et al., 2001).

I.2.2.b) Biofilms électroactifs formés en milieu marin

En plaçant deux électrodes en milieu marin, l'une enfouie dans les sédiments et l'autre dans l'eau de mer (Figure I-4), on obtient un courant électrique. En 2002, les recherches de deux équipes montrent que cet environnement marin s'avère être riche en microorganismes dits électroactifs car capables de transférer directement leurs électrons à la surface conductrice de l'électrode (Bond et al., 2002; Tender et al., 2002).

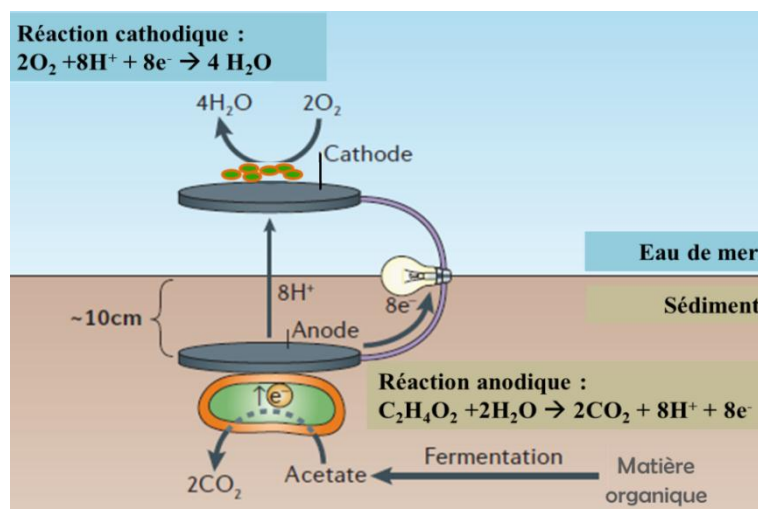


Figure I-4 : Biofilms électroactifs marins adapté de (Lovley, 2006).

Les électrons sont transférés par les microorganismes dits électroactifs à l'anode et peuvent alors migrer vers la cathode dans le circuit électrique extérieur mis en place entre les deux électrodes (Figure I-5). Les protons migrent eux dans le milieu liquide et passent du compartiment anodique vers le compartiment cathodique. A la cathode, les électrons et les protons participent à la réduction du dioxygène catalysée par les microorganismes aérobies électroactifs présents dans l'eau de mer.



Figure I-5 : Microorganismes électroactifs en surface des électrodes. (Source LGC).

I.1.3) Mécanismes de transfert d'électrons chez les microorganismes électroactifs

Les échanges d'électrons entre les microorganismes et l'électrode support peuvent être classés en deux catégories : les transferts dits « indirects », c'est-à-dire nécessitant un médiateur lors de la réaction d'oxydoréduction ; en opposition aux transferts « directs ».

I.1.3.a) Mécanismes de transfert indirects

Oxydation à l'anode d'un produit du métabolisme bactérien

Les premières études mettaient en avant la production de courant par l'oxydation d'un produit du métabolisme microbien. En effet, certains microorganismes produisent des composés qui fournissent des électrons lorsqu'ils sont oxydés à l'anode. Ces composés sont des produits de fermentation tels que l'hydrogène comme le montre la Figure I-6.

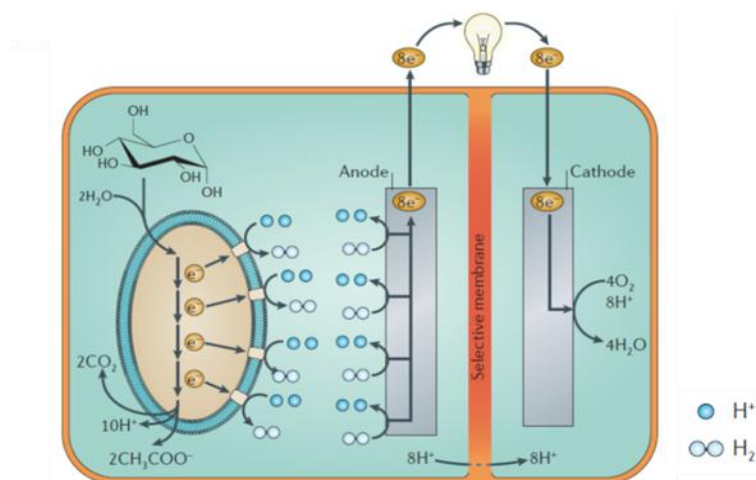


Figure I-6 : Représentation schématique d'une réaction anodique dont le transfert d'électron est réalisé par un produit du métabolisme cellulaire (ici, l'hydrogène) (Lovley, 2006).

C'est dans les années 60 qu'ont été mis au point les premiers biofilms anodiques faisant intervenir l'utilisation de l'hydrogène par les microorganismes. Cependant, la production de courant était faible. Il y a quelques années, les travaux de Niessen ont permis d'obtenir de fortes densités de courant en utilisant des bactéries du genre *Clostridium* (*C. beijerinckii*, *C. butyricum*) ou *Escherichia coli* K12 productrices d'hydrogène (Niessen et al., 2004a; Niessen et al., 2004b; Niessen et al., 2006). Un maximum de 30 A.m^{-2} (polarisation à $+ 0,2 \text{ V/Ag-AgCl}$) a été atteint lors d'une de ses études réalisée avec des anodes en carbure de tungstène immergées dans des sols soumis à un traitement thermique. D'autres produits du métabolisme bactérien, comme le sulfate, sont utilisés par les biofilms électroactifs. Le sulfate est réduit par des bactéries sulfato-réductrices en HS^- ou S^{2-} (fonction du pH) qui eux s'oxydent directement à l'anode en S^0 (Reimers et al., 2006).

Transfert électronique par des médiateurs artificiels

Les bactéries non fermentaires peuvent également réaliser une production de courant mais alors le transfert d'électrons est médié par la présence de médiateurs artificiels dans le biofilm. Les médiateurs électrochimiques artificiels (ou exogènes) sont des molécules synthétiques pouvant se recycler par réactions d'oxydoréduction successives à l'électrode et par les bactéries (Figure I-7). Parmi les médiateurs artificiels utilisés on peut citer : la thionine (Thurston et al., 1985), le rouge neutre (Park et al., 2000), les dérivés de la quinone (Park et al., 1997). Les souches bactériennes ayant été mises en présence de ces médiateurs sont du genre *Pseudomonas* sp (Shukla et al., 2004), *Bacillus* (Shukla et al., 2004), *Proteus* (Kim et al., 2000) et *Escherichia* (Park & Zeikus, 2000).

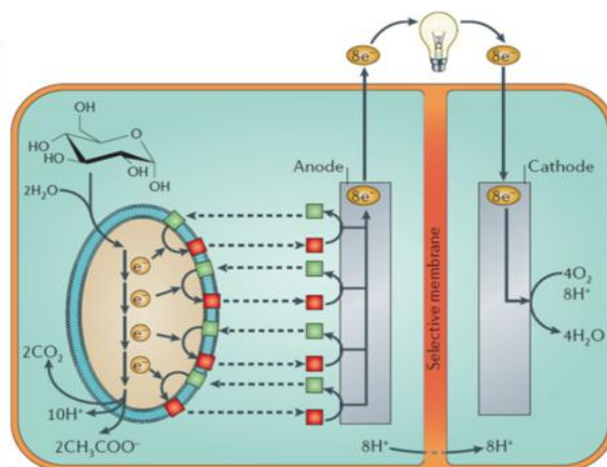


Figure I-7 : Représentation schématique d'une réaction anodique dont le transfert électronique est réalisé par un médiateur électrochimique artificiel ou exogène (Lovley, 2006).

Transfert électronique par des médiateurs produits par les microorganismes

Certains microorganismes sont capables de produire et de sécréter eux-mêmes des médiateurs électrochimiques, ce sont des médiateurs dits endogènes. Le mécanisme de transfert électronique est le même que celui des médiateurs exogènes présenté précédemment (Figure I-7).

Shewanella oneidensis produit de la riboflavine (Figure I-8) (Marsili et al., 2008; von Canstein et al., 2008) qui, lorsqu'elle est retirée du réacteur fait chuter le transfert électronique de plus de 70 %. *Pseudomonas aeruginosa* peut assurer une production de courant par

l'intermédiaire de deux médiateurs, la pyocyanine (Figure I-8) et les phénazines (Rabaey et al., 2004). La production du médiateur de type quinone ACNQ (2-amino-3-dicarboxy-1,4-naphtaquinone) par *Shewanella putrefaciens*, permet d'augmenter de 50 % la densité de courant lorsqu'il est produit et excrété dans le milieu extracellulaire (Freguia et al., 2010).

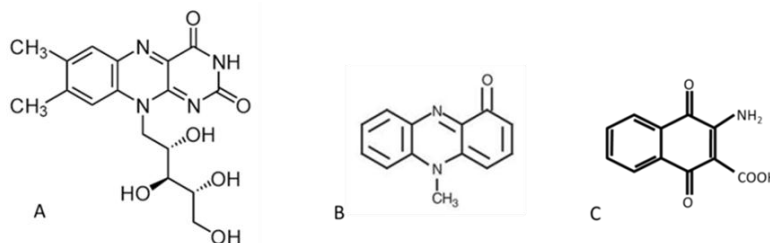


Figure I-8 : Formules semi-développées des molécules de (A) riboflavine, (B) pyocyanine et (C) ACNQ.

I.1.3.b) Mécanismes de transfert directs

Les mécanismes de transfert directs font appel aux composants de la paroi bactérienne et de ses appendices externes.

Transfert via des protéines membranaires

L'échange d'électrons s'effectue directement de la cellule à l'électrode par l'intermédiaire de certaines de ces protéines membranaires (Figure I-9). Les protéines les plus souvent mises en cause lors des échanges électroniques sont les cytochromes contenant des groupements constitués d'un noyau porphyrine comportant du fer. Les cytochromes font partie de la chaîne respiratoire bactérienne et il en existe plusieurs classes.

Deux composants de la voie respiratoire Mtr, les cytochromes MtrC et les protéines OmcA, forment un complexe de protéines sur la membrane externe de *Shewanella oneidensis* impliqué dans la réduction directe des minerais, d'anodes, et de flavines (Strycharz-Glaven et al., 2011).

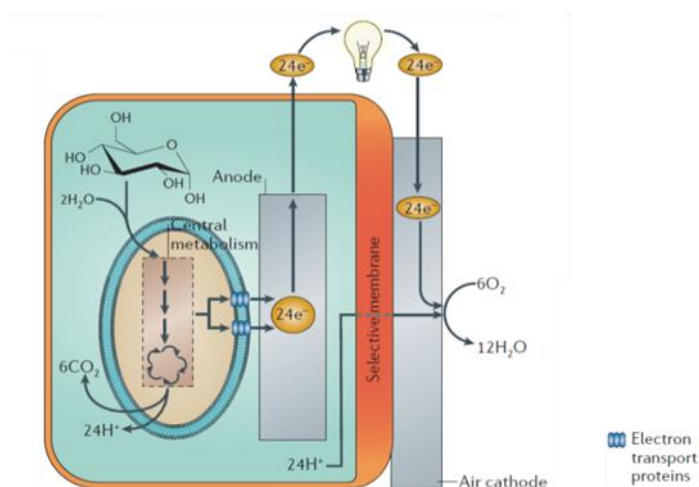


Figure I-9 : Représentation schématique d'une PCM dont le transfert d'électrons est directement assuré par une protéine membranaire (Lovley, 2006).

Chez *Geobacter sulfurreducens*, ce sont les cytochromes de type c : OmcB, OmcS et OmcE qui assurent le transfert d'électrons vers l'anode ou des oxydes de fer (Leang et al., 2003; Holmes et al., 2006). La Figure I-10 représente un modèle du mécanisme de transfert des électrons chez *Geobacter sulfurreducens*.

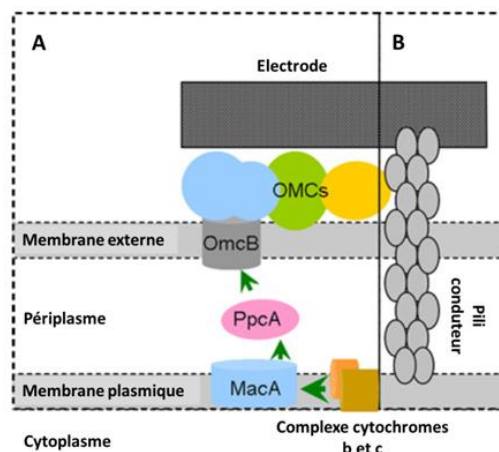


Figure I-10 : Modèle du transfert d'électrons chez *Geobacter sulfurreducens* par (A) les cytochromes de type c membranaires et (B) les pili conducteurs (Yang et al. 2012).

Transfert via des pili conducteurs

Le dernier mécanisme découvert, en 2005, est le transfert via des connexions extracellulaires. Ces connexions font partie des appendices de surface des microorganismes : les pili. Ces pili impliqués dans le transfert électronique vers l'électrode sont appelés pili conducteurs (ou « nanowires »). *Geobacter sulfurreducens* possède des pili (Childers et al., 2002). En 2005, une étude montre qu'un mutant de *Geobacter sulfurreducens pilA⁻*, c'est-à-dire défectueux dans la formation de ces pili, n'est plus en mesure de réduire les oxydes de fer (Reguera et al., 2005). Une autre étude menée par microscopie à force atomique (AFM) consistant à appliquer deux nanoélectrodes à chaque extrémité d'un pilus a permis l'obtention d'une relation de la loi d'Ohm ($U = RI$) prouvant la conductivité électrique des pili (Figure I-11) (Reguera et al., 2005). Cette conductivité serait due à la teneur en cytochromes dans les pili (Logan, 2009). Cependant cette théorie a été réfutée. En effet, ces nanowires présentent une conductivité de type métallique comprenant un réseau de nanofilaments dérivés d'acides aminés naturels (Malvankar et al., 2011).

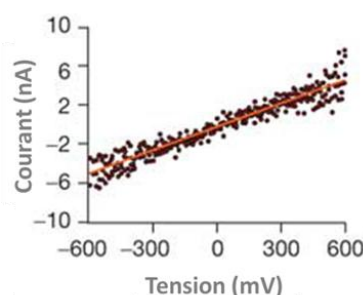


Figure I-11 : Réponse ohmique du pilus de *Geobacter sulfurreducens* obtenue avec l'aide d'un microscope à force atomique (Reguera et al., 2005).

Ces pili conducteurs ont également été mis en évidence chez *Shewanella oneidensis* (Gorby et al., 2006). Toutefois chez cette espèce, il a récemment été découvert que ces « pili » sont en

réalité des excroissances de la membrane externe composée de cytochromes (Pirbadian et al., 2014).

Les pili conducteurs permettent de connecter les cellules bactériennes à l'électrode mais permettent aussi de créer un réseau entre les bactéries elles-mêmes (Figure I-12 A) (Gorby et al., 2006). Ainsi, les échanges électroniques ne se font pas uniquement avec les bactéries en contact avec l'électrode mais avec l'ensemble des cellules microbiennes composant le biofilm (Figure I-12 B) (Franks & Nevin, 2010).

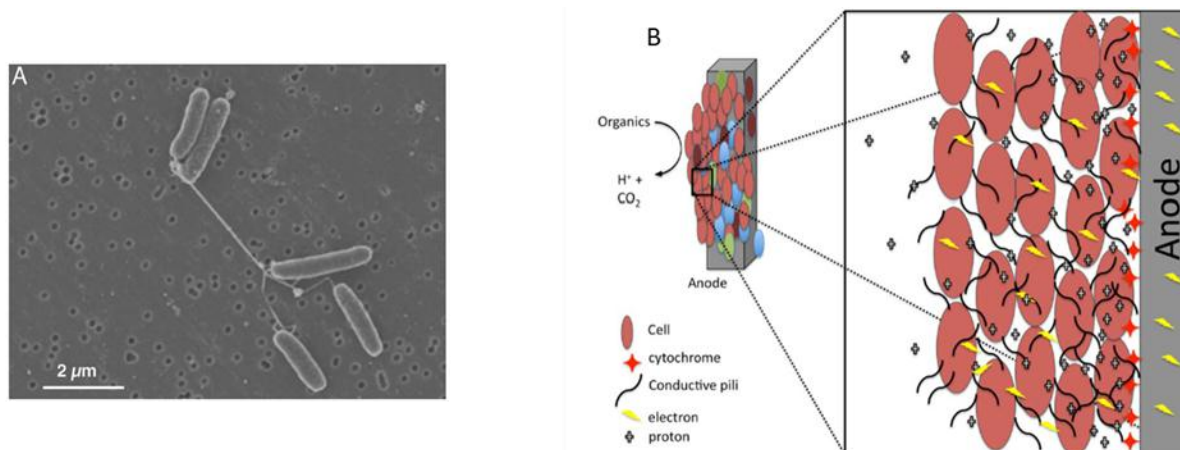


Figure I-12 : (A) Pili connectant des cellules bactériennes de *Shewanella oneidensis* entre elles (MEB) (Gorby et al., 2006); (B) Représentation schématisée des transferts d'électrons chez *Geobacter sulfurreducens* (Franks & Nevin, 2010).

I.1.3.c) Bilan des mécanismes de transfert d'électrons

En l'état actuel des connaissances, il est impossible de définir les mécanismes de transfert d'électrons mis en jeu avec des biofilms multiespèces. L'approche mécanistique nécessite donc de travailler avec des microorganismes modèles (souches pures). Le Tableau I-1 représente une liste non exhaustive des travaux réalisés avec différents genres bactériens, qui présentent un et parfois plusieurs mécanismes de transfert d'électrons. *Shewanella*, *Geobacter* et *Escherichia coli* sont particulièrement étudiés. En cas de transfert indirect médié par un médiateur endogène, les molécules impliquées sont parfois identifiées. On retrouve différents composés tels que les phénazines, les quinones, les riboflavines et les acides humiques. Par contre, la protéine de surface impliquée majoritairement lors de transferts directs d'électrons est le cytochrome c.

Tableau I-1 : Liste non exhaustive de PCM fonctionnant grâce à divers mécanismes de transfert d'électrons.

Microorganismes	Substrat	Mécanisme de transfert d'e⁻	Anode	Références
<i>Clostridium butyricum</i>	Lactate	Transfert indirect : oxydation de H ₂	Noir de platine	Karube et al., 1977
<i>Proteus vulgaris</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur artificiel, thiotine	Carbone vitreux réticulé	Thurston et al., 1985
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Glucose	Transfert indirect : oxydation de H ₂	Acier inoxydable avec du noir de platine	Tanisho et al., 1989
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Dextrose	Transfert indirect : oxydation de H ₂ S	Graphite imprégné de Co(OH) ₂	Habermann & Pommer, 1991
<i>Clostridium isatidis</i>	Dextrose	Transfert direct	Graphite	Compton et al., 2000
<i>Proteus vulgaris</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur artificiel, thiotine	Carbone vitreux	Kim et al., 2000
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur artificiel, 2-Hydroxy-1,4-Naphtaquinone	Carbone graphite	Park et al., 2000
<i>Clostridium butyricum</i>	Glucose	Transfert direct	Graphite	Park et al., 2001
<i>Desulforomonas acetoxidans</i>	Acétate	Transfert direct	Graphite	Bond et al., 2002
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Glucose	Transfert direct	Graphite	Chaudhuri & Lovley, 2003
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Lactate	Transfert direct	Graphite	Kim et al., 2002
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Transfert indirect : oxydation de H ₂	Platine modifié avec de la polyaniline	Schroder et al., 2003
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Transfert indirect : oxydation de H ₂	Platine modifié avec du polytétrafluoroaniline (Pt/PTFA)	Niessen et al., 2004a

<i>Geopsychrobacter electrodiphilus</i>	Fumarate	Transfert direct	Graphite	Holmes et al., 2004c
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	Pyruvate	Transfert direct	Graphite	Holmes et al., 2004a
<i>Geothrix fermentans</i>	Acétate	Transfert indirect : médiateur endogène	Graphite	Bond & Lovley, 2005
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur endogène phénazine, pyocyanine	Graphite	Rabaey et al., 2005
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acétate	Transfert direct : pili conducteurs	Graphite	Reguera et al., 2005 Reguera et al., 2006
<i>Shewanella oneidensis</i>	Lactate	Transfert direct : pili conducteurs	Graphite	Gorby et al., 2006
<i>Geobacter sulfurreducens</i>		Transfert direct : cytochrome type c	Graphite	Holmes et al., 2006
<i>Shewanella oneidensis</i>	Lactate	Transfert direct : cytochrome type c	Graphite	Bretschger et al., 2007
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	Glucose	Transfert direct	Graphite	Liu et al., 2007
<i>Desulfitobacterium hafniense</i>	Formate	Transfert indirect : médiateur endogène, acides humiques	Graphite	Milliken & May, 2007
<i>Acidiphilium sp</i>	Glucose	Transfert direct	Graphite	Malki et al., 2008
<i>Shewanella oneidensis</i>	Lactate	Transfert indirect : médiateur endogène, riboflavine	Carbone vitreux	Marsili et al., 2008 von Canstein et al., 2008
<i>Brevibacillus sp</i>	Acétate	Transfert indirect : médiateur endogène, phénazines de <i>P.aeruginosa</i>	Graphite	Pham et al., 2008
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur endogène, quinones	Tissu de carbone Graphite + PTFE (polytétrafluoroéthylène)	Qiao et al., 2008 Zhang. T. et al., 2008

<i>Rhodopseudomonas</i>	Acétate	Transfert direct	Tissu de carbone ou graphite	Xing et al., 2008
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Glucose	Transfert direct	Feutre de carbone	Zhang. L. et al., 2008
<i>Corynebacterium sp</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur endogène, composés redox	Feutre de carbone	Liu. M et al., 2010
<i>Thermincola ferriacetica</i>	Acétate	Transfert direct	Graphite	Marshall & May, 2009
<i>Bacillus subtilis</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur endogène, quinones	Tissu de carbone	Nimje et al., 2009
<i>Shewanella loihica</i>	Lactate	Transfert direct	Verre couvert d'oxyde indium	Liu. H. et al., 2010
<i>Escherichia coli</i>	Glucose	Transfert indirect : médiateur artificiel 2-Hydroxy-1,4-Naphtaquinone	Tissu et feutre de carbone	Ho et al., 2011
		Transfert indirect : médiateur artificiel, thiotine		
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Acétate	Transfert direct	Graphite	Strycharz et al., 2011
<i>Shewanella oneidensis</i>	Lactate	Transfert direct	Graphite	Fitzgerald et al., 2012

I.1.4) Maîtrise et optimisation de la formation des biofilms électroactifs

I.1.4.a) L'inoculum

Il peut être utile d'enrichir un inoculum afin d'obtenir une plus grande quantité de microorganismes électroactifs. Diverses méthodes ont été mises au point. L'une de ces techniques consiste à transférer le biofilm obtenu sur une électrode vers une autre en mettant en contact l'électrode vierge avec une électrode inoculée (Liu et al., 2008). Un biofilm primaire est formé sur une électrode en graphite polarisée au potentiel de 0,2 V/Ag-AgCl. L'inoculum est de l'eau usée domestique et le substrat de l'acétate. Une fois le biofilm formé, l'électrode de graphite modifiée (présence du biofilm) est alors introduite dans un réacteur stérile contenant la même solution nutritive à base d'acétate et est connectée en parallèle à une autre électrode en graphite propre. Cette deuxième électrode est elle aussi polarisée à 0,2 V/Ag-AgCl. Le biofilm secondaire se met en place plus rapidement et permet la génération d'une densité de courant plus importante que le biofilm primaire. Une autre méthode consiste à inoculer le nouveau réacteur contenant l'électrode avec l'effluent provenant d'une pile microbienne déjà fonctionnelle (Aelterman et al., 2008).

I.1.4.b) Le substrat

Le **Tableau I-1** présente uniquement des substrats simples qui sont facilement dégradés par les microorganismes. Cependant, différents types de substrats peuvent être utilisés par les biofilms électroactifs. Trois types de substrats sont utilisés (Pant et al., 2010) :

Les substrats simples

Le glucose, le fructose, l'acétate, le lactate et le fumarate font partie des substrats simples qui sont les plus utilisés.

Les substrats complexes

Parmi les substrats complexes utilisés par les biofilms électroactifs on trouve des polysaccharides comme l'amidon (Niessen et al., 2004b), la cellulose (Chen et al., 2011) ou la chitine (Rezaei et al., 2009). Toutefois ces composés, en raison de leurs structures plus complexes, sont plus difficilement assimilables par les microorganismes. De plus, tous les microorganismes ne possèdent pas les enzymes nécessaires à l'assimilation de tels substrats complexes. Les substrats complexes peuvent également provenir d'eaux usées qu'elles soient domestiques ou industrielles. Ces dernières possèdent généralement des teneurs en matières organiques élevées.

Les substrats « atypiques »

Les substrats « atypique » peuvent être considérés comme des substrats ne pouvant être classés dans les catégories saccharides ou milieux environnementaux pouvant être revalorisés (eaux usées). Un exemple de ces substrats est l'urine (Ieropoulos et al., 2012).

I.1.4.c) L'électrolyte

La salinité de l'électrolyte doit être aussi élevée que possible afin de favoriser les transferts ioniques, mais, en revanche, elle ne doit pas dépasser le niveau que peuvent tolérer les microorganismes. En effet, il faut veiller à ce que la salinité du milieu ne soit pas trop élevée pour ceux-ci en leur imposant alors une pression osmotique transmembranaire trop forte (Kim et al., 2008). Lefebvre et al., qui a travaillé avec une grande gamme de concentration de NaCl, a confirmé une augmentation de puissance jusqu'à 345 mM de NaCl (Lefebvre et al., 2012).

Avec des concentrations plus élevées, 690 mM de NaCl, on observe un impact négatif avec une diminution de la puissance de 50%.

L'eau de mer présente une conductivité élevée, autour de $5,4 \text{ S m}^{-1}$, principalement en raison d'une concentration de NaCl d'environ 517 mM, et la microflore marine est parfaitement adaptée pour fonctionner dans ces environnements salins (Rousseau et al., 2014). Lorsqu'on travaille en milieu naturel, on se trouve donc en présence de microorganismes adaptés à ce milieu.

On peut également travailler en milieux synthétiques, d'une part pour maîtriser le milieu et, d'autre part pour l'optimiser. A l'anode, pour que l'électrode soit un accepteur d'électrons, il faut que la présence d'autres accepteurs d'électrons comme le dioxygène soit limitée. Lorsqu'on souhaite qu'un biofilm électroactif catalyse une réaction d'oxydation d'un substrat avec l'anode comme accepteur d'électrons il est alors préférable d'être en anaérobiose. Cette atmosphère est obtenue en laboratoire avec un barbotage de diazote dans le milieu réactionnel.

Le pH du milieu a également une incidence sur les performances des biofilms électroactifs. Ainsi, un pH neutre indique une plus faible concentration de protons qu'en pH acide. A pH neutre, un brassage de l'électrolyte est nécessaire afin d'amener les protons à la cathode. D'autre part, des pH extrêmes, trop acides ou trop basiques, peuvent diminuer le métabolisme bactérien voire provoquer la mort cellulaire (Gil et al., 2003).

I.1.4.d) L'électrode

Un grand nombre d'espèces bactériennes ont été capables de fournir un courant électrique. Ces courants ont été obtenus sur des anodes qui sont principalement à base de carbone, de graphite ou de carbone vitreux (Tableau I-1). Les anodes à base de carbone sont de bons matériaux d'électrode car ils répondent aux critères suivants : être un bon conducteur, avoir une bonne biocompatibilité, avoir un coût bas, avoir une bonne durabilité, être résistant à la corrosion et être chimiquement stable dans l'électrolyte.

Contrairement aux fibres et tissus de carbone, le feutre et la mousse de carbone ont une structure tridimensionnelle. Cette particularité structurale leur permet d'augmenter la surface active de l'électrode et donc d'améliorer les performances fournies par les biofilms électroactifs. La structuration en surface de l'électrode peut être réalisée artificiellement à différentes échelles. Ainsi, la structuration des électrodes en acier inoxydable s'est avérée être un avantage pour la formation de biofilm de *Geobacter sulfurreducens*. En doublant la rugosité de surface de 2 à 4 μm , la densité de courant a été multipliée d'un facteur 1,6 (Pons et al., 2011).

La structuration de surface est considérée comme un traitement mécanique pouvant favoriser la formation de biofilm électroactif. D'autres traitements peuvent également être réalisés à la surface des électrodes, des traitements chimiques. Le procédé de modification chimique est censé être efficace pour l'immobilisation des métaux, des oxydes métalliques ou autres composés actifs sur des supports, tels que des matériaux de carbone, afin d'améliorer les performances électrochimiques des biofilms électroactifs. Une anode revêtue avec de l'oxyde ferrique a vu sa densité de puissance s'accroître sensiblement de 8 à 30 mW m^{-2} en raison de l'enrichissement de bactéries capables de réduire les métaux à sa surface (Kim et al., 2005).

I.2.) Biocathodes

I.2.1) Généralités

Toutes les études présentées dans la partie I.1.3) Mécanismes de transfert d'électrons portent sur le biofilm anodique. Sur l'anode sont présents des microorganismes capables de catalyser des réactions d'oxydation. Les travaux qui s'intéressent à la catalyse de réactions de réduction à la cathode sont beaucoup moins nombreux (Figure I-13). En effet, il y a 5 fois moins de travaux portant sur les biocathodes que sur les bioanodes. De plus, l'étude des biocathodes est arrivée plus tardivement, 2002, que celle concernant les bioanodes.

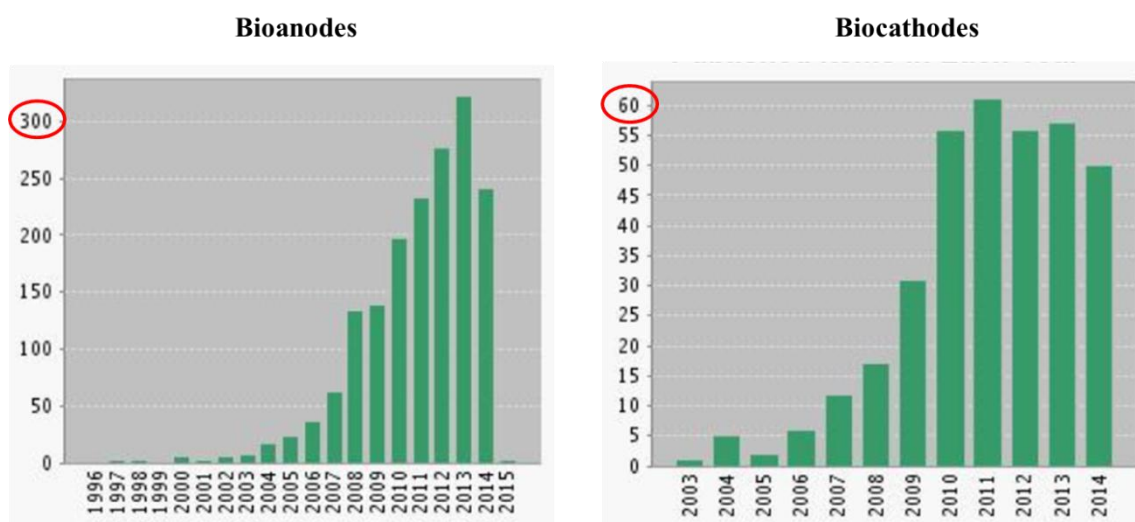
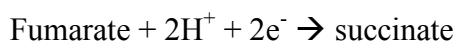
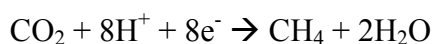
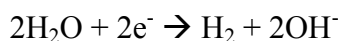
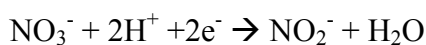
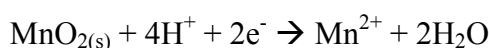


Figure I-13 : Nombres de publications par années concernant les bioanodes et les biocathodes.

Dans les biocathodes ce sont des biofilms microbiens qui catalysent les réactions de réduction, c'est-à-dire le passage des électrons du matériau de l'électrode vers l'accepteur final en solution. Cet accepteur final d'électron peut être du dioxygène, du fumarate, du dioxyde de carbone (Tableau I-2). Voici quelques exemples de réactions pouvant se dérouler à la biocathode (He & Angenent, 2006) :



Des biocathodes peuvent être formées aussi bien à partir de souches pures comme *Geobacter sulfurreducens* que d'inocula mixtes tels que les eaux usées (Huang et al., 2011). Le métabolisme microbien au sein des biocathodes permet, en plus de la production d'électricité, de produire des molécules d'intérêt (Lovley, 1991) ou d'éliminer des composés indésirables.

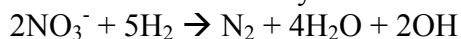
Tableau I-2 : Types d'accepteurs d'électrons et de microorganismes dans les biocathodes. Valeurs des densités de courant vs électrode standard d'hydrogène (ESH). Valeurs vs Ag-AgCl et Hg-HgCl₂ converties vs ESH en ajoutant respectivement 0,195 et 0,244 V. (a) Densité de courant/puissance non fournie. (b) Potentiels de début et de fin de réduction du dioxygène (Huang et al., 2011).

Accepteur d'e ⁻	Inoculum	Densité de courant (puissance) ^a et/ou potentiel imposé ^b	Références
O ₂	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	690 mA.m ⁻²	Rabaey et al., 2008
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	300-650 mA.m ⁻²	
	<i>Winogradskyella poriferorum</i>	1 mA.m ⁻² ; + 0 V	Erable et al., 2010
	<i>Acinetobacter johsonii</i>	0,4 mA.m ⁻² ; + 0 V	
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	140 mA.m ⁻² , - 0,20 V	Freguia et al., 2010
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	- 0,21 à + 0,05 V ^{a,b}	Cournet et al., 2010
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	- 0,21 à + 0,06 V ^{a,b}	
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	- 0,09 à + 0,11 V ^{a,b}	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	- 0,12 à + 0,10 V ^{a,b}	
	<i>Branhamella catarrhalis</i>	- 0,20 à + 0,06 V ^{a,b}	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	- 0,24 à + 0,05 V ^{a,b}	
	<i>Escherichia coli</i>	- 0,25 à + 0,03 V ^{a,b}	
	<i>Shigella flexneri</i>	- 0,27 à + 0,03 V ^{a,b}	
	<i>Acinetobacter sp.</i>	- 0,17 à + 0,08 V ^{a,b}	
	<i>Kingella kingae</i>	- 0,25 à + 0,02 V ^{a,b}	
	<i>Kingella denitrificans</i>	- 0,25 à + 0,03 V ^{a,b}	
	<i>Micrococcus luteus</i>	- 0,22 à + 0,05 V ^{a,b}	
	<i>Bacillus subtilis</i>	- 0,25 à + 0,06 V ^{a,b}	
	<i>Staphylococcus carnosus</i>	- 0,28 à + 0,02 V ^{a,b}	
	<i>Lactococcus lactis</i>	80 mA.m ⁻² ; + 0 V	Présente étude
U(VI)	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	- 0,3 V ^a	Gregory & Lovley, 2005
C ₂ Cl ₄	<i>Geobacter lovleyi</i>	160 mA.m ⁻² , - 0,5 V	Strycharz et al., 2008
Fumarate	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	20,5 A.m ⁻² , - 0,40 V	Dumas et al., 2008a
	<i>Geobacter lovleyi</i>	160 mA.m ⁻² , - 0,30 V	Strycharz et al., 2008
CO ₂	<i>Methanobacterium palustre</i>	140 A.m ⁻³ , - 0,50 V	Cheng et al., 2009

I.2.1.a) Bioremédiation

Les eaux usées industrielles ou domestiques contiennent des composés azotés et parfois des éléments-traces métalliques (Lu & Li, 2012). Les biocathodes peuvent être utilisées pour aider leur élimination.

L'azote est éliminé habituellement par des procédés biologiques tels que la nitrification (oxydation de l'ammonium en nitrate) et la dénitrification (réduction du nitrate en N_2) (Knowles, 1982). La dénitrification est réalisable bioélectrochimiquement (Park et al., 2005). Le taux de réduction du nitrate en diazote gazeux était de 98 % avec un courant appliqué de 200 mA. La réaction ayant lieu à la cathode en feutre de graphite était :



Ces biocathodes montrent une réduction efficace des nitrates tout en générant un courant électrique (Zhu et al., 2013).

Les éléments-traces métalliques sous forme ionique que peuvent contenir les eaux usées ne sont pas biodégradables. Ils peuvent toutefois être éliminés en servant d'accepteurs d'électrons. En effet, une fois réduits ces composés sont précipités et peuvent ainsi être éliminés. Il existe des bactéries capables de réduire le chromium (Cr-VI) plus efficacement qu'une cathode abiotique (Huang et al., 2010).

I.2.1.b) Electrosynthèse microbienne

L'électrosynthèse microbienne est un domaine émergent de la recherche bioélectrochimique. Les électrons provenant de la cathode sont utilisés par le biofilm électroactif pour réduire le dioxyde de carbone et d'autres produits chimiques en une variété de composés organiques (Figure I-14) (Lovley & Nevin, 2011; Wang & Ren, 2013).

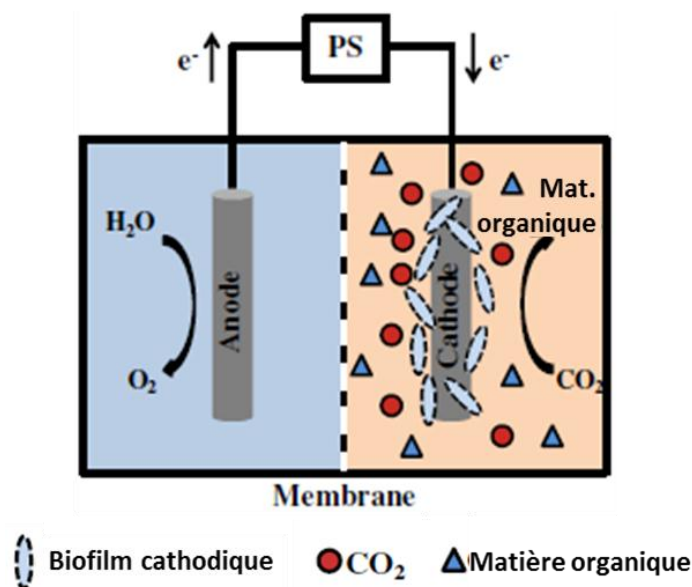


Figure I-14 : Principe de base de l'électrosynthèse microbienne (Wang & Ren, 2013).

C'est en 2009-2010, qu'a été introduit le concept d'électrosynthèse microbienne. Les premiers résultats présentent la production de méthane avec une biocathode acclimatée avec *Methanobacterium palustre* et une anode abiotique (Cheng et al., 2009). Une autre étude a montré que les biofilms de *Sporomusa ovata* pouvaient utiliser les électrons fournis par la

cathode pour réduire le dioxyde de carbone en des petites quantités d'acétate et de 2-oxobutyrate (Nevin et al., 2010). Une culture mixte issue d'eaux usées de brasserie a été rapportée pour générer du méthane, de l'acétate, et de l'hydrogène gazeux à partir d'une biocathode avec un potentiel de - 590 mV/ESH et avec du dioxyde de carbone en tant que seule source de carbone (Marshall et al., 2012). Enfin, cette année a été démontrée la production de méthane par la catalyse de la réduction du dioxyde de carbone à la cathode par des bactéries appartenant aux espèces *Methanobacterium palustre*, *Methanobrevibacter arboriphilus*, et *Methanocorpusculum parvum* (Jiang et al., 2014).

I.2.2) Biocathodes anaérobies

En l'absence de dioxygène, les composés comme le nitrate, le sulfate, les oxydes de fer, les oxydes de manganèse, le sélénate, l'arséniate, le fumarate et de dioxyde de carbone peuvent être réduits. Cependant, en comparant les potentiels d'oxydo-réduction des différents couples, le nitrate ($E'_0 \text{ NO}_3^-/\text{NO}_2^- = +0,43 \text{ V}$), le manganèse ($E'_0 \text{ MnO}_2/\text{Mn}^{2+} = +0,60 \text{ V}$), et le fer ($E'_0 \text{ Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = +0,77 \text{ V}$) sont les plus avantageux d'un point de vue énergétique (Figure I-15).

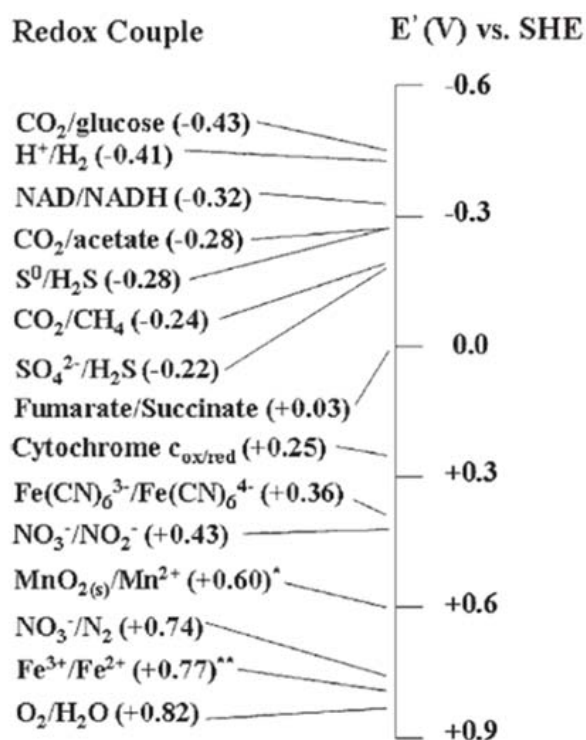


Figure I-15 : Tableau des potentiels redox de couple (à pH 7 ; * à pH 7,2 ; ** à pH 2) (He & Angenent, 2006).

La réduction du nitrate en nitrite peut être réalisée par les bactéries présentes dans les sédiments comme la souche *Geobacter metallireducens*. Celles-ci ont aussi la capacité d'utiliser une électrode comme unique donneur d'électrons (Gregory et al., 2004). Des densités de courant de l'ordre de $0,4 \text{ A.m}^{-2}$ (en valeur absolue) ont été atteintes sur une électrode de graphite polarisée à - 0,5 V/Ag-AgCl.

D'autres composés peuvent être réduits à la cathode comme le dioxyde de carbone, le fumarate ou l'uranium. En effet, en utilisant une électrode en graphite comme unique donneur

d'électrons, *Geobacter sulfurreducens* est capable de réduire le fumarate en succinate en obtenant $0,4 \text{ A.m}^{-2}$ avec un potentiel de $-0,5 \text{ V/Ag-AgCl}$ à la cathode (Gregory et al., 2004).

Cette même souche est capable de réduire l'uranium U(VI) soluble en U(IV) qui précipite sur l'électrode polarisée à $-0,5 \text{ V/Ag-AgCl}$. Ainsi jusqu'à 87% de l'uranium réduit par *Geobacter sulfurreducens* est récupéré à la surface de l'électrode (Gregory & Lovley, 2005).

I.2.3) Biocathodes aérobies

A l'instar des procédés anodiques, dans lequel l'électrode sert d'accepteur d'électrons, une cathode peut servir de donneur d'électrons quand un accepteur terminal avec un grand potentiel d'oxydation comme le dioxygène est présent et qu'aucun autre donneur d'électrons ne concurrence l'électrode. Le dioxygène est l'accepteur final d'électrons le plus utilisé pour la réaction cathodique à cause de son potentiel standard élevé ($E_0 \text{ O}_2/\text{H}_2\text{O} = +1,23 \text{ V/ESH}$), de son abondance dans l'air et de son coût réduit.

Plusieurs études utilisent des microorganismes pour faciliter l'oxydation de métaux de transition tels que Mn(II) ou Fe(II), pour la livraison d'électrons au dioxygène. Le manganèse est un métal abondant qui peut être facilement transformé entre ses états d'oxydation. La réduction de Mn(IV) et l'oxydation de Mn(II) peuvent toutes deux être réalisées par l'activité microbienne à un rythme élevé (He & Angenent, 2006). Semblable au manganèse, le fer est également un métal de transition, avec un avantage supplémentaire que le fer est 5 à 10 fois plus abondant que le manganèse (Nealson & Saffarini, 1994).

Des biofilms marins électroactifs, sont eux, capables de catalyser directement la réduction du dioxygène en eau. En effet, il a été démontré que les électrodes en acier inoxydable placées en milieux marins sont colonisées par des bactéries qui sont capables de catalyser les réactions de réduction du dioxygène (Mollica & Travis, 1976). À partir de 2005, la réduction du dioxygène par électrocatalyse microbienne a été perçue comme une possibilité de réaliser des cathodes microbiennes (Bergel et al., 2005; Clauwaert et al., 2007). La formation de biocathodes aérobies par des biofilms électroactifs marins sera étudiée plus en détails dans le paragraphe I.3) Catalyse électromicrobienne de la réduction du dioxygène en milieu marin.

I.2.3.a) Bilan des travaux sur les biocathodes aérobies

Le [Tableau I-3](#) présente une liste de biocathodes aérobies mises en œuvre depuis 2005.

Les études réalisées sur les biocathodes utilisent essentiellement comme inoculum des milieux complexes tels que les eaux usées, l'eau de mer et le sol. Seuls quelques auteurs décrivent des biocathodes aérobies fonctionnant en culture pure (Carbajosa et al., 2010; Cournet et al., 2010; Erable et al., 2010; Freguia et al., 2010). Cela peut s'expliquer par le fait que les performances électrochimiques sont plus difficiles à obtenir en culture pure qu'en culture mixte. De plus, on constate que les expérimentations en culture pure ont une durée de fonctionnement plus courte que celles réalisées en culture mixte. Des efforts doivent donc être réalisés afin d'améliorer le fonctionnement des biocathodes formées avec des souches pures.

Tableau I-3 : Tableau regroupant des biocathodes aérobies (d'après Erable et al., 2012).

	Cathode	Inoculum	Mode opératoire	Electrochimie	Temps	Référence
Eaux usées	Feutre de carbone	Mélange boue/sédiment	M9 continu (6 L.h ⁻¹)	PCM (100Ω)	7 mois	Clauwaert et al., 2007
	Graphite granulaire brut	Boue anaérobie/anoxique	Solution nutritive en continu (1,3 mL.min ⁻¹)	PCM (50 Ω)	40 jours	Chen et al., 2008
	Carbone vitreux	Boue activée	Eaux usées synthétiques en continu	PCM (250Ω)	10 mois	Aldrovandi et al., 2009
	Feutre de carbone	Boue activée	Tampon phosphate en batch alimenté	PP + 0,242 V	27 jours	Liang et al., 2009
	Fibres de graphite (brosse)	Boue activée aérobie	Solution nutritive en batch alimenté	PCM (100Ω)	9 jours	You et al., 2009
	Feutre de carbone	Boue aérobie	Tampon phosphate en batch alimenté	PCM (51 Ω)	100 jours	Cha et al., 2010
	Graphite granulaire brut	Boue anaérobie/anoxique	Eaux usées synthétiques en continu (13 mL. min ⁻¹)	PCM (30 Ω)	400 jours	Chen et al., 2010a
	Graphite granulaire	Boue aérobie	Effluent anodique en continu (0,2 mL. min ⁻¹)	PCM	180 jours	Chen et al., 2010b
	Feutre de carbone	Boue aérobie	Eaux usées synthétique en continu (0,003 L.h-1)	PCM (50Ω)	40 jours	Wang et al., 2012
	Tissu de carbone	Eaux usées brute	Continu	PCM (100Ω)	6 mois	Cristiani et al., 2013
	Feuille de carbone	Boue activée/digérée	Effluent anodique continu et batch alimenté en acétate	PCM	350 jours	Wang et al., 2013
	Tige de graphite	Eaux usées brute	Eaux usées brutes, batch puis continu, pH 7	PCM (1000Ω)	50 jours	Sevda & Sreekrishnan, 2014

	Cathode	Inoculum	Mode opératoire	Electrochimie	Temps	Référence
Eau de mer/ Eau douce	Acier inoxydable UNS S31254	Eau de mer	Sur site (Mer Méditerranée)	PP - 0,3 V	12 jours	Bergel et al., 2005
		Eau de mer	Sur site (Mer Méditerranée)	PCM (33Ω)	3 mois	Dumas et al., 2007
		Eau de mer	Sur site (Mer Méditerranée)	PCM (25Ω)	60 jours	Dumas et al., 2008b
		Eau de mer/biofilm marin aérobie	Batch et en continu (60 mL.h ⁻¹)	PP - 0,2 V	10-40 jours	Erable et al., 2010
	Acier inoxydable UNSS 31254	Eau de mer	Batch	PP	16 jours	Faimali et al., 2011
	Plaque de graphite	Sédiment/eau	Batch	PCM	45 jours	Renslow et al., 2011
	Feutre de carbone	Sédiment/eau douce	Batch	PCM (1000Ω)	40 jours	Song & Jiang, 2011
	Tissu de carbone	Sédiment estuaire	Batch alimenté en acétate	PCM (1000Ω)	40 jours	Zhang et al., 2012
	Graphite	Sédiment marin/Eau de mer	Batch	PCM (5000Ω)	10 semaines	Strycharz-Glaven et al., 2013
	Acier inoxydable 254SMO	Eau de mer	Sur site (La Tremblade)	PCM	6 mois	Erable et al., 2013
Sol	Fibres de graphite	Terre	Batch	PCM (500Ω)	400 heures	Zhang et al., 2011
	Graphite	Rizière	Batch	PCM (1000Ω)	30 jours	Chen et al., 2012

	Cathode	Inoculum	Mode opératoire	Electrochimie	Temps	Référence
Culture pure	Feutre de carbone	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Mackintosh mod, pH 2 batch	PP 0 V	28 jours	Carbajosa et al., 2010
	Carbone vitreux	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Tampon phosphate à 0,1 M et pH 7 en batch	CV	1 heure	Cournet et al., 2010
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>			1 heure	
		<i>Brevundimonas diminuta</i>			1 heure	
		<i>Burkholderia capacia</i>			1 heure	
		<i>Branhamella catarrhatis</i>			1 heure	
		<i>Enterobacter cloacae</i>			6 heures	
		<i>Escherichia coli</i>			3 heures	
		<i>Shigella flexneri</i>			3heures	
		<i>Acinetobacter sp.</i>			1 heure	
		<i>Kingella kingae</i>			3 heures	
		<i>Kingella denitrificans</i>			1 heure	
		<i>Micrococcus luteus</i>			1 heure	
		<i>Bacillus subtilis</i>			1 heure	
		<i>Staphylococcus carnosus</i>			1 heure	
	Acier inoxydable 254SMO	<i>Acinetobacter johsonii</i> <i>Winogradskyella poriferorum</i>	Eau de mer	PP - 0,2 V	10 jours	Erable et al., 2010
	Papier de carbone	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Shewanella putrefaciens</i>	Milieu nutritif en batch	PP (en PCM, -0,2 V)	< 1 jour	Freguia et al., 2010

Cette différence sur les durées de fonctionnement se retrouve aussi entre deux modes de fonctionnement, le mode batch et le continu. En effet, les réacteurs bioélectrochimiques fonctionnant en continu ont une durée de vie plus longue que les réacteurs en mode batch, jusqu'à 7 mois de fonctionnement (Clauwaert et al., 2007). Cela est dû à l'apport constant en substrat nécessaire à la vie des microorganismes. Les expérimentations effectuées sur site ont également des durées de fonctionnement pouvant aller jusqu'à plusieurs mois.

Concernant les matériaux, les cathodes sont majoritairement des cathodes à base de carbone. En effet, le carbone a été utilisé sous différentes formes : papier, tissu et feutre de carbone, ainsi que du graphite en plaque, en fibres ou encore granulaire. Quelques travaux mettent en œuvre des cathodes en acier inoxydable.

I.2.3.b) Limitations des biocathodes aérobies

Les biocathodes à oxygène présentent différentes limitations de fonctionnement. Ces limitations concernent le pH de l'électrolyte, le transfert de dioxygène, la sensibilité des microorganismes aux espèces réactives de l'oxygène et les salissures de l'interface dues à l'alcalinisation du milieu ou à la biomasse.

pH

Les conditions acides favorisent la réduction du dioxygène (Erable et al., 2012). Dans ce contexte, on passe par les réactions de réduction du dioxygène impliquant les protons et permettant d'extraire le peroxyde d'hydrogène produit. Toutefois, le développement microbien requière le plus souvent un environnement dont le pH se situe entre 6 et 9 (Gil et al., 2003). Les conditions opératoires dans les biocathodes sont donc néfastes au thermodynamisme et aux cinétiques des réactions de réduction du dioxygène. Cependant, la formation de biocathode avec des microorganismes acidophiles tels qu'*Acidithiobacillus ferrooxidans* est possible. Cette souche est capable de fournir des densités de courant élevées, 5 A.m^{-2} , avec une électrode de graphite polarisée à 0 V/ECS, à pH 2 et sous une atmosphère de dioxygène (Carbajosa et al., 2010).

Transfert du dioxygène

La solubilité du dioxygène est faible en milieu aqueux, $2,8.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ à 20°C en eau pure. Le transfert de masse du dioxygène vers la surface cathodique est donc une limitation au fonctionnement des biocathodes. De plus, le biofilm formé en surface de la cathode est également une barrière à la diffusion du dioxygène à l'électrode. Toutefois, le transfert du dioxygène peut être favorisé par agitation du milieu lorsque les expérimentations sont menées en batch (Ter Heijne et al., 2011). Cette technique a été utilisée lors de nos expérimentations de formations de biocathodes par des bactéries marines.

Sensibilité des microorganismes aux espèces réactives de l'oxygène

La réduction du dioxygène peut être amenée à produire diverses espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène, l'ion radical superoxyde ainsi que le radical hydroxyle (en présence de fer, réaction d'Haber-Weiss). Ces espèces réactives de l'oxygène sont connues pour causer des dommages sur tous les composants des cellules microbiennes.

Les dégradations des protéines, des lipides et de l'ADN ont pour conséquence d'inhiber la croissance voire d'éliminer les microorganismes électroactifs.

Salissures de la surface cathodique

Une alcalinisation à la surface cathodique résulte de la consommation des protons et/ou de la production d'ions hydroxydes. Cette alcalinisation a pour conséquence d'induire la précipitation d'hydroxydes qui vont adhérer à la surface de l'électrode. Par exemple, l'eau de mer contient des ions calcium qui vont précipiter en hydroxydes de calcium avec l'augmentation des densités de courant.

I.3) Catalyse électromicrobienne de la réaction de réduction du dioxygène sur acier inoxydable en milieu marin

I.3.1) Historique

En milieux marins ouverts, il est pratiquement impossible d'empêcher la formation de biofilms sur la surface d'un matériau métallique. L'environnement aqueux contient une grande diversité de communautés microbiennes (Holmes et al., 2004b).

Les premières études concernant les réactions de réduction du dioxygène en milieux marins, sont apparues dans les années 70, lorsque l'implication de microorganismes dans les phénomènes de corrosion a été admise. C'est en 1976, qu'a été démontrée la corrélation entre la formation d'un biofilm marin sur une cathode métallique et la corrosion (Mollica & Travis, 1976). Depuis l'admission qu'une partie de la corrosion pouvait être due à l'action de microorganismes est apparu le terme de biocorrosion.

Au cours d'un projet sur une pile abiotique en milieu marin, il s'est avéré que le biofilm développé sur la cathode permettait l'augmentation des taux de réduction du dioxygène (Hasvold et al., 1997).

Plus récemment, le premier exemple de pile à combustible microbienne (PCM) en eau de mer (Gênes, Italie) formée d'une anode abiotique et d'une cathode recouverte d'un biofilm marin aérobie a été mise au point (Bergel et al., 2005). Les auteurs ont montré que la densité de puissance maximale fournie par la pile chutait de 270 mW.m⁻² à 2,8 mW.m⁻² lorsque le biofilm était enlevé de la cathode. Les auteurs ont donc démontré que les microorganismes au sein du biofilm étaient capables de catalyser la réduction du dioxygène. La formation de biofilms marins à la surface d'une électrode en acier lui confère des caractéristiques cinétiques proches de celles du platine, en ce qui concerne la catalyse de la réduction du dioxygène.

Deux autres essais de PCM en eau de mer (Gênes, Italie) ont permis de confirmer le bon fonctionnement des biocathodes marines. Des courants de 140 mA.m⁻² ont été fournis après un et trois mois de fonctionnement (Dumas et al., 2007; Dumas et al., 2008b).

Ces systèmes catalytiques obtenus en milieu marin ouvert ont été adaptés en laboratoire, en batch puis en fonctionnement continu (Erable et al., 2010). Le biofilm marin et l'eau de mer utilisés proviennent du même site où ont eu lieu les essais *in situ* cités précédemment (Gênes, Italie). Sous un potentiel de -0,2 V/Ag-AgCl, 600 mA.m⁻² sont obtenus au bout de 40 jours de fonctionnement. Deux espèces bactériennes hétérotrophes ont été isolées à partir du biofilm marin. Les densités de courant enregistrées sont faibles. Elles sont respectivement de 5 et 10 mA.m⁻² pour *Acinetobacter johnsonii* et *Winogradskyella poriferorum*.

Ainsi, les performances des réactions de réduction du dioxygène par les biofilms marins restent encore relativement faibles, assurant des densités de courant le plus souvent inférieures à 1 A.m^{-2} , comme indiqué dans une revue récente qui leur est consacrée ([Erable et al., 2012](#)).

I.3.2) Acier inoxydable et dioxygène

I.3.2.a) Acier inoxydable

L'acier est un alliage de fer et de carbone. Pour être classé dans la catégorie inoxydable, l'acier doit contenir au minimum 10,5 % de chrome et moins de 1,2 % de carbone. La teneur en carbone est limitée à un maximum de 1,2 % en masse afin d'éviter la formation de carbures qui sont préjudiciables au matériau en matière de fragilité.

Les aciers inoxydables sont plus couramment classés selon leur structure micrographique. Ce type de classification a permis de mettre en évidence quatre grandes familles d'aciers inoxydables ([Cunat, 2014](#)) :

- les aciers inoxydables martensitiques : ces alliages comprennent de 12 à 18 % de chrome et des teneurs en carbone pouvant atteindre environ 1 %. Ils ont la particularité d'allier des caractéristiques mécaniques à une bonne résistance à la corrosion.
- les aciers inoxydables ferritiques : la proportion de chrome dans ces alliages varie de 11 à 17 % et peut atteindre jusqu'à 24 à 28 %. On parle alors d'aciers ferritiques à haute teneur en chrome ou encore d'aciers superferritiques. Ces derniers présentent une bonne résistance à la corrosion par piqûres et par crevasses en milieux riches en chlorures.
- les aciers inoxydables austénitiques : les nuances les plus utilisées sont caractérisées par des teneurs en chrome et en nickel respectivement de 17 à 18 % et 8 à 14 %. La teneur en carbone est très basse et leur stabilité peut être améliorée par des éléments tels que le molybdène (2 à 3 %). Ce dernier leur confère une bonne tenue dans les milieux acides et ceux générateurs de piqûres ou de corrosion caverneuse. L'acier inoxydable utilisé lors de nos travaux, l'acier inoxydable 254SMO, fait partie cette famille. Sa composition exacte est détaillée dans le chapitre matériel et méthodes.
- les aciers inoxydables austéno-ferritiques : les principales nuances contiennent 22 à 25 % de chrome et 4 à 7 % de nickel. Les incorporations de molybdène (3 ou 4 %) et d'azote (0,1 à 0,3 %) permettent de limiter les corrosions par piqûres et par crevasses.

Les normes relatives à la classification des aciers inoxydables sont variables d'un pays à l'autre. Les aciers inoxydables sont couramment désignés par leurs noms commerciaux ou selon le système américain AISI (American Iron and Steel Institute) ou encore selon la norme UNS (Unified Numbering System).

I.3.2.b) Le dioxygène et sa réduction sur acier inoxydable

Le dioxygène est une molécule composée de deux atomes d'oxygène, notée O_2 , qui compose 20,95 % en volume et 23,2 % en masse de l'atmosphère terrestre. C'est un gaz indispensable à de nombreuses formes de vie, auxquelles il fournit le comburant nécessaire au fonctionnement des cellules (respiration cellulaire). Il n'est en revanche pas indispensable au fonctionnement de certaines bactéries dites anaérobies, et il est même toxique pour les

bactéries anaérobies strictes. Dans l'environnement aquatique, le dioxygène dissous est une condition nécessaire à la vie de très nombreuses espèces.

Dans l'eau de mer aérée, la concentration en oxygène dissous est très variable puisqu'elle dépend des facteurs physiques (échanges à l'interface air/eau de mer, diffusion et mélanges au sein de la masse d'eau), chimiques (phénomènes de photo-oxydation, réactions d'oxydation chimiques) et biologiques (mécanismes de respiration et de nitrification par les organismes aquatiques, production par photosynthèse).

La dissolution du dioxygène est gouvernée par une loi physique (la loi d'Henry) et dépend de la pression atmosphérique, de la température et de la salinité de l'eau (Benson & Krauser, 1984). La solubilité de l'oxygène décroît lorsque la température et la salinité augmentent, mais elle augmente avec la pression. La solubilité du dioxygène est de $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ à 20°C en eau pure alors qu'elle est réduite à $2,3 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ à 20°C pour une salinité de 35‰, ce qui correspond à la salinité de l'eau de mer (35g de sels/kg d'eau de mer) (Figure I-16).

Salinité (‰)	Température ($^\circ\text{C}$)											
	0.0	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0	35.0	40.0	45.0	50.0	
0.0	456.6	398.9	352.6	314.9	283.9	257.9	235.9	217.0	200.4	185.6	172.2	
5.0	441.1	385.9	341.6	305.5	275.7	250.7	229.5	211.3	195.3	181.0	168.1	
10.0	426.1	373.3	330.8	296.2	267.6	243.7	223.3	205.7	190.3	176.6	164.1	
15.0	411.7	361.1	320.5	287.3	259.9	236.8	217.3	200.4	185.5	172.3	160.2	
20.0	397.7	349.3	310.4	278.6	252.3	230.2	211.4	195.1	180.8	168.0	156.4	
25.0	384.1	337.9	300.7	270.2	244.9	223.7	205.6	190.0	176.2	163.9	152.7	
30.0	371.0	326.9	291.2	262.0	237.8	217.4	200.1	185.0	171.7	159.9	149.0	
35.0	358.4	316.2	282.0	254.1	230.9	211.3	194.6	180.1	167.4	155.9	145.5	
40.0	346.2	305.8	273.2	246.4	224.1	205.4	189.3	175.4	163.1	152.1	142.0	
45.0	334.4	295.8	264.6	238.9	217.6	199.6	184.2	170.8	159.0	148.3	138.6	
50.0	323.0	286.1	256.3	231.7	211.3	194.0	179.2	166.3	154.9	144.7	135.3	

Figure I-16 : Solubilité du dioxygène dans l'eau en fonction de sa température et de sa salinité (d'après Ramsing & Gundersen, <http://www.unisense.com/files/PDF/Diverse/Seawater%20&%20Gases%20table.pdf>)

La réduction du dioxygène sur acier inoxydable se déroule à des potentiels très négatifs (- 0,7 V/ECS) et selon un mécanisme direct à 4 électrons (Erable et al., 2012):

En milieu alcalin



En milieu acide



I.3.3) Possibles mécanismes de la réduction du dioxygène par les microorganismes

Les catalyseurs utilisés dans les réactions de réduction du dioxygène peuvent être organisés en trois groupes: produits chimiques, enzymatiques et microbiens. Le platine est un des catalyseurs chimiques. Il offre des performances catalytiques élevées, mais sa disponibilité limitée, son coût, et le fort impact environnemental lié à sa production sont de sérieux inconvénients. Les organismes vivants ont développé des oxydoréductases efficaces afin d'être capables de réduire le dioxygène. Les enzymes représentent une bonne solution catalytique. Cependant, les enzymes sont très sensibles à toutes sortes d'inhibition, exigent

souvent des opérations chimiques complexes pour être immobilisées sur les surfaces d'électrodes et leur durée de vie ne dépasse généralement pas quelques jours en conditions de fonctionnement. La catalyse microbienne, elle, est plus adaptée à la production à long terme et les microorganismes possèdent divers mécanismes de réduction du dioxygène.

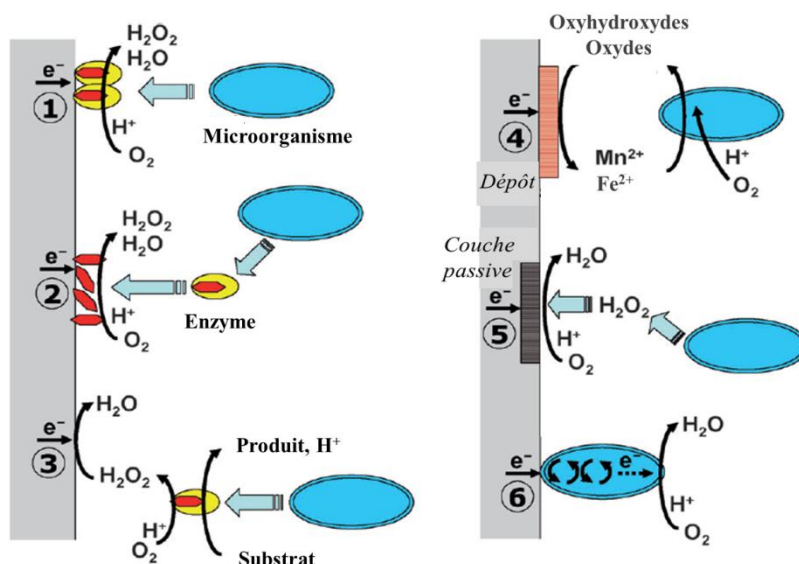


Figure I-17 : Représentation schématisée des possibles mécanismes pouvant expliquer la réduction du dioxygène par les microorganismes à la surface d'une électrode. (1) Catalyse directe par des enzymes sécrétées par les bactéries. (2) Catalyse directe par des porphyrines piégées dans le biofilm. (3) Catalyse indirecte médiée par le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries. (4) Catalyse indirecte médiée par le manganèse ou les oxydes de fer. (5) Modification des propriétés catalytiques des oxydes de fer par les biofilms marins. (6) Transfert d'électrons directement de la cathode aux microorganismes (Erable et al., 2012).

I.3.3.a) Catalyse directe par les enzymes sécrétées par les bactéries

La première hypothèse émise concernant les mécanismes de transfert d'électrons de la cathode vers les microorganismes est l'implication de composés appartenant aux biofilms marins (Scotto et al., 1985). Il a été montré que l'addition d'azide de sodium, qui est un inhibiteur d'enzymes de la chaîne respiratoire bactérienne, dans de l'eau de mer naturelle fait baisser le potentiel libre de + 350 à + 100 mV/ECS, indiquant une diminution de la catalyse de la réduction du dioxygène (Scotto & Lai, 1998). Ainsi, il en a été conclu que le mécanisme de réduction du dioxygène était dû à des protéines extracellulaires adsorbées en surface de la cathode (Figure I-17 1). Ces protéines peuvent être des enzymes telles que les superoxydes dismutases, des catalases, et des peroxydases qui catalysent respectivement :

- la dismutation de l'ion radical superoxyde : $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
- la dismutation du peroxyde d'hydrogène : $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$
- et l'oxydation de plusieurs substrats (notés X- H_2) : $2X-H_2 + H_2O_2 \rightarrow 2X-H^{\bullet} + 2H_2O$

Ces enzymes extracellulaires sont donc suspectées d'être capables de catalyser la réaction de réduction du dioxygène à la cathode.

I.3.3.b) Catalyse directe par des porphyrines piégées dans le biofilm

La catalase et certaines oxydases sont des enzymes possédant un groupement prosthétique constitué de porphyrines. En effet, des spots d'hémine (protoporphyrine contenant un ion de fer ferrique) ont provoqué la réduction du dioxygène en surface d'une électrode en acier inoxydable (Iken et al., 2008). Ces porphyrines peuvent donc fonctionner « seules », et ainsi continuer de catalyser la réduction du dioxygène, même lorsque l'enzyme a été dégradée (Figure I-17 2).

I.3.3.c) Catalyse indirecte médiée par le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries

La présence d' H_2O_2 à l'interface biofilm/cathode serait un paramètre clé pour l'amélioration du potentiel d'abandon. Les bactéries marines peuvent produire de l' H_2O_2 (Denis et al., 1989). Ce dernier a notamment été détecté dans des biofilms marins à des concentrations allant jusqu'à 8 mM. De plus, dans un biofilm de *Streptococcus gordonii*, la concentration en H_2O_2 est passée de 0,7 mM à 1,6 mM en l'espace de 6 heures et en présence de 10 mM de glucose (Liu.X et al., 2011). Le modèle expérimental (Figure I-17 3) présume qu'une oxydase naturellement présente dans le biofilm produit de l' H_2O_2 tout en oxydant un composé organique.

I.3.3.d) Catalyse indirecte médiée par le manganèse ou les oxydes de fer

Dans les environnements contenant du manganèse ou des ions ferreux, les bactéries manganèse et ferri-oxydantes peuvent oxyder ces ions en oxydes. Ces derniers sont ensuite réduits en ions sur la cathode (Figure I-17 4). Un tel cycle des ions manganèse par les bactéries manganèse oxydantes (MOB) a pour conséquence un transfert d'électrons de la cathode vers le dioxygène, qui est l'accepteur final d'électrons des bactéries manganèse oxydantes (Nguyen et al., 2007; Rhoads et al., 2005).

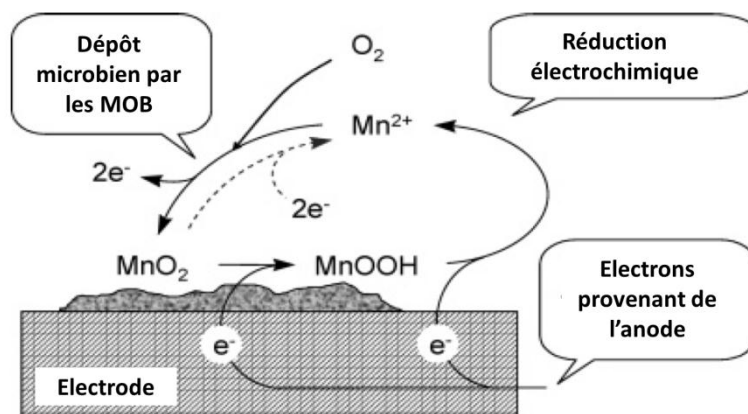


Figure I-18 : Représentation schématique du dépôt et de la ré-oxydation du manganèse utilisé comme réaction cathodique (Rhoads et al., 2005).

Dans la première étape du cycle, qui est abiotique, MnO_2 est réduit en un hydroxyde MnOOH , en acceptant un électron de la cathode. Ensuite, grâce à l'apport d'un deuxième électron par la cathode, MnOOH est réduit encore une fois pour donner Mn^{2+} . La deuxième étape fait intervenir les MOB (manganese oxidizing bacteria) comme par exemple *Leptothrix discophora*, qui oxydent Mn^{2+} en MnO_2 en donnant deux électrons au dioxygène. Ce mécanisme est résumé dans la Figure I-18.

I.3.3.e) Modification des propriétés catalytiques des oxydes de fer par les biofilms marins

Des concentrations en peroxyde d'hydrogène de 3 à 8 mM ont été mesurées dans un biofilm mature de deux mois, et il a été suggéré que le peroxyde d'hydrogène pourrait partiellement réduire les oxydes de fer de la couche de passivation de la cathode (Lin & Gurol, 1998). Selon ce modèle, le peroxyde d'hydrogène produit par le biofilm a un effet indirect en améliorant les propriétés catalytiques des oxydes de fer (Figure I-17 5).

La chaîne de réactions est initiée par la formation d'un complexe de surface de H_2O_2 avec les oxydes de fer ($Fe(III)OH$) (Réaction 1) (Figure I-19). $(H_2O_2)_s$ représente les espèces de surface du peroxyde d'hydrogène qui peuvent effectuer un transfert d'électron, le $Fe(III)$ est alors transformé en $Fe(II)$ (Réaction 2 et 3) qui est un meilleur catalyseur de réduction du dioxygène. De plus, le radical peroxyde HO_2^\bullet formé est un radical très actif qui interagit directement avec d'autres composés.

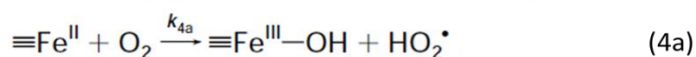
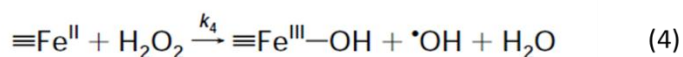
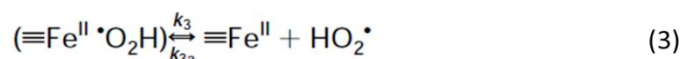
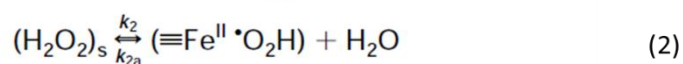
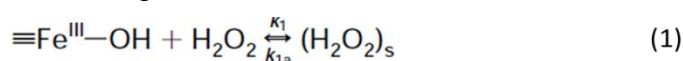


Figure I-19 : Mécanismes proposé pour la décomposition de peroxyde d'hydrogène sur des oxydes de fer $Fe(III)$ (Lin & Gurol, 1998).

Il convient également de noter que, même lorsque la concentration de H_2O_2 est aussi faible que 1,10 à 3 mM, la vitesse d'oxydation de sites ferreux par H_2O_2 (Réaction 4) est supposée être 700 fois plus rapide que celle de sites ferreux par le dioxygène (Réaction 4a). Par ailleurs, la décomposition de H_2O_2 peut conduire à la génération de radicaux hydroxyles (OH^\bullet) (Réaction 4), qui peuvent éventuellement conduire à une augmentation des réactions d'oxydoréduction de composés organiques.

I.3.3.f) Transfert d'électrons directement de la cathode aux microorganismes

Ce mécanisme serait semblable à celui des bioanodes (Rosenbaum et al., 2011) (Figure I-17 6). Une étude récente a démontré qu'en modifiant les conditions environnementales (anaérobiose/aérobiose) une bioanode pouvait être « convertie » en biocathode (Blanchet et al., 2014). De plus, ce phénomène est réversible. C'est pourquoi le transfert électronique via des protéines membranaires pourrait être réalisé dans les deux sens. Ainsi, les cytochromes c et les hydrogénases peuvent être impliqués dans des transferts directs d'électrons de la cathode vers la cellule bactérienne (Figure I-20).

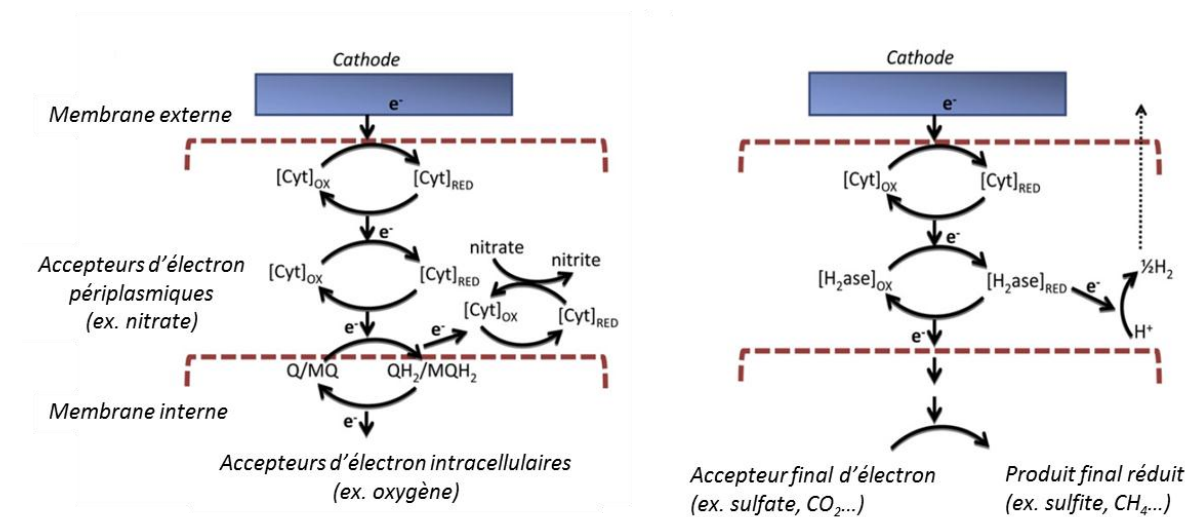


Figure I-20 : Transfert direct d'électrons impliquant les cytochromes c (gauche) et un partenariat cytochromes-hydrogénases (droite) (Rosenbaum et al., 2011).

I.3.4) Caractérisation des biofilms marins

I.3.4.a) Caractérisation microscopique des biofilms marins sur acier par microscopie en épifluorescence

La microscopie en épifluorescence est une technique utilisant un microscope optique en tirant profit du phénomène de fluorescence. On peut ainsi observer divers objets, substances (organiques ou inorganiques) ou échantillons d'organismes morts ou vivants. Elle fait désormais partie des méthodes de recherche classiques et continue à se développer avec l'imagerie moléculaire. Un microscope confocal est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est donc pas directement observé par l'utilisateur ; celui-ci voit une image recomposée par ordinateur. Le microscope confocal fonctionne en lumière réfléchiée ou en fluorescence. La plupart du temps, on utilise un laser comme source de lumière. On parle alors de microscope confocal à balayage laser (MCBL).

La microscopie en épifluorescence qu'elle soit confocale ou non nécessite que les cellules produisent un composé fluorochrome. Certains microorganismes sont capables d'en synthétiser lorsqu'ils sont génétiquement modifiés, par exemple, lors de l'intégration de matériel génétique codant pour un fluorochrome tel que la Gfp. Cette intégration a été réalisée par transformation sur certaines de nos souches bactériennes lors des travaux présentés plus loin dans ce manuscrit. Les transformations effectuées ont été réalisées par électroporation.

Cependant, il existe également de nombreuses techniques de marquage comme le marquage au DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) qui se lie aux acides nucléiques. L'acridine orange (AO) est un fluorochrome lipophile, légèrement cationique capable d'interagir avec l'ADN et d'entrer dans des compartiments acides tels que les lysosomes.

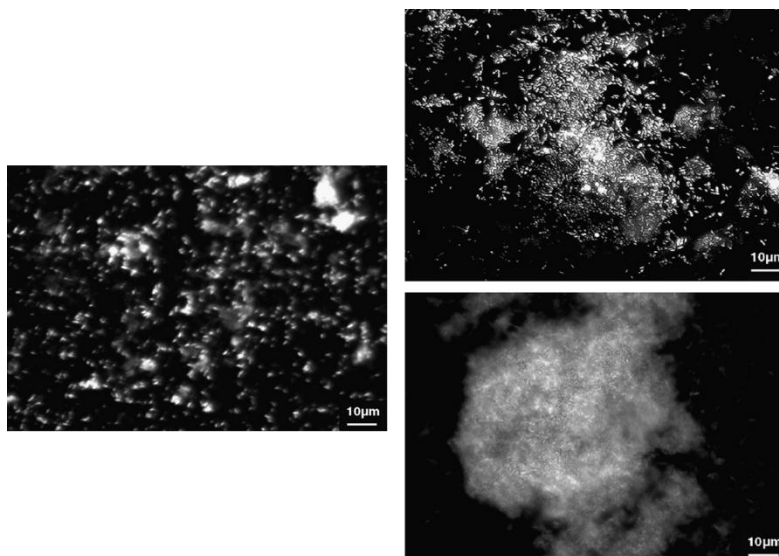


Figure I-21 : Images de microscopie en épifluorescence d'un biofilm de *Geobacter sulfurreducens* sur acier non polarisé (image de gauche) ou polarisé à -0,6 V/Ag-AgCl (Dumas et al., 2008a).

La microscopie en épifluorescence en deux dimensions est facile à traiter et permet d'obtenir des informations sur la structure externe des biofilms. Lors d'une étude, cette technique a été mise en œuvre afin de mesurer le taux de recouvrement des biofilms de *Geobacter sulfurreducens* sur des électrodes en acier inoxydable polarisées à - 0,6 V/Ag-AgCl ou non (Dumas et al., 2008a). L'application d'un potentiel constant induit une augmentation du recouvrement des électrodes (Figure I-21).

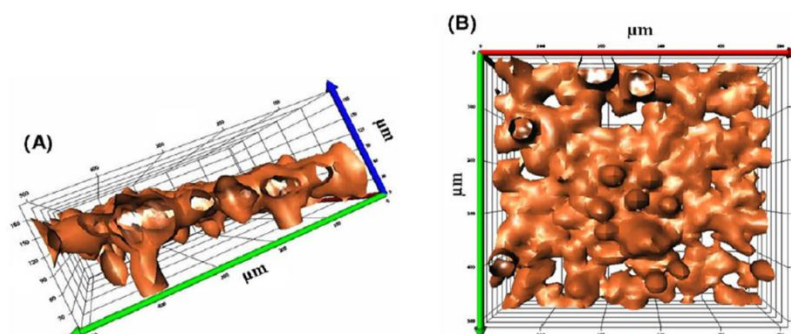


Figure I-22 : Structure 3D d'un biofilm anodique formé sur une électrode en acier inoxydable après 18 jours de polarisation à - 0,1 V/ECS. Vue de profil (A) et vue du dessus de l'électrode (B) (Erable & Bergel, 2009).

Les avantages de la microscopie en épifluorescence en trois dimensions et de la microscopie confocale à balayage laser sont leur capacité à afficher la structure tridimensionnelle des biofilms entièrement hydratés et de permettre de suivre l'évolution du biofilm *in situ* ou en temps réel. Il a ainsi été découvert que les biofilms électroactifs peuvent avoir une structure complexe en profondeur, sous un aspect superficiel uniforme. Une électrode en acier inoxydable en contact avec des sédiments marins et polarisée à - 0,1 V/ECS a révélé un biofilm avec une structure en piliers d'environ 80-90 µm d'épaisseur (Figure I-22) (Erable & Bergel, 2009).

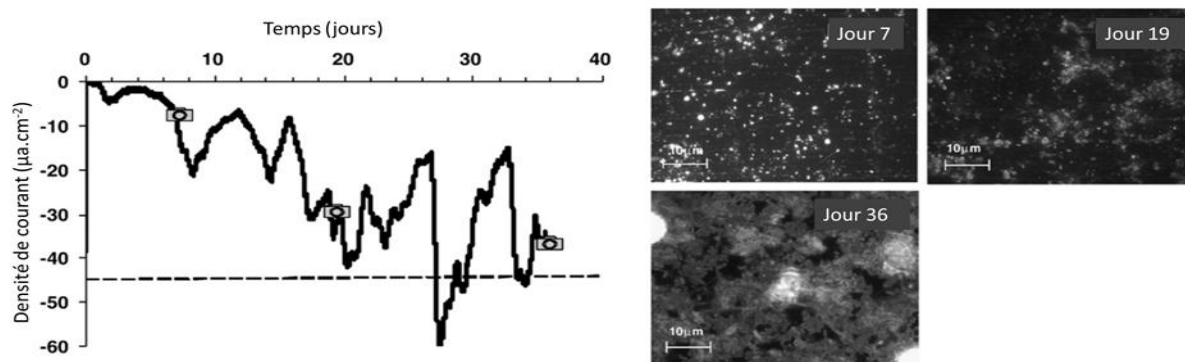


Figure I-23 : Evolution du courant obtenu en réacteur continu inoculé avec 10 mL de biofilm et alimenté en eau de mer naturelle à partir du 2^{ème} jour. L'électrode en acier inoxydable est polarisée à - 0,2 V/Ag-AgCl. Images de microscopie en épifluorescence à différents stades de formation du biofilm en surface de l'acier (Erable et al., 2010).

Une autre étude s'intéresse cette fois à la formation de biofilms à la cathode (Erable et al., 2010). Le développement d'un biofilm sur la surface d'électrodes en acier inoxydable polarisées à - 0,2 V/Ag-AgCl a été suivi par microscopie en épifluorescence en extrayant une électrode au bout de 7, 19 et 36 jours de travail (Figure I-23). Après une polarisation de 7 jours, le taux de couverture de biofilm était de 8 %. Il a été de 26 % après 19 jours et atteint 63 % à la fin de l'expérience (jour 36). La reconstruction 3D indique une épaisseur moyenne du biofilm de 20 µm. La structure du film biologique est constituée de cellules microbiennes en grappes couvrant 60 à 65 % de la surface.

I.3.4.b) Caractérisation de la diversité microbienne

Méthodes de caractérisation de la diversité microbienne

Des travaux pionniers utilisant des techniques culturales ont établi que les bactéries étaient largement distribuées dans les océans. Toutefois l'importance numérique des bactéries marines est restée insoupçonnée jusqu'aux années 1970 à cause des limitations des techniques de culture et des difficultés à discriminer les cellules par la microscopie classique. Les estimations de l'abondance bactérienne dans les océans étaient alors de quelques dizaines à plusieurs centaines de bactéries par millilitre d'eau de mer. L'arrivée de techniques de microscopie en épifluorescence permet maintenant de les estimer, pour le même volume, à des dizaines de milliers voire des millions. Les microorganismes apparaissent désormais comme dominants dans la biosphère et en particulier dans le milieu marin où ils peuvent atteindre 90 % de la biomasse des écosystèmes (Whitman et al., 1998). Avec des efforts d'isolement et surtout l'avènement des phylogénies moléculaires, il a été mis en évidence une diversité microbienne marine inattendue et conséquente.

La caractérisation de la diversité microbienne reposant sur des techniques de biologie moléculaire est apparue au XX^e siècle, à la suite de l'élaboration des lois de la génétique, la découverte des chromosomes et l'identification de l'ADN comme support chimique de l'information génétique.

Afin d'analyser les communautés et la diversité microbienne des biofilms marins réduisant le dioxygène plusieurs techniques de biologie moléculaire existent. La majorité de ces techniques ont pour cible l'ADNr 16S qui est la « carte d'identité » des bactéries. L'ARN ribosomique 16S (Figure I-24) est le constituant ARN de la petite sous-unité ribosomique des

procaryotes, il doit son nom à sa vitesse de sédimentation qui est de 16 Svedberg. Le gène codant les ARN ribosomiques 16S est composé d'environ 1542 paires de bases. Il est présent chez tous les procaryotes en plusieurs copies.

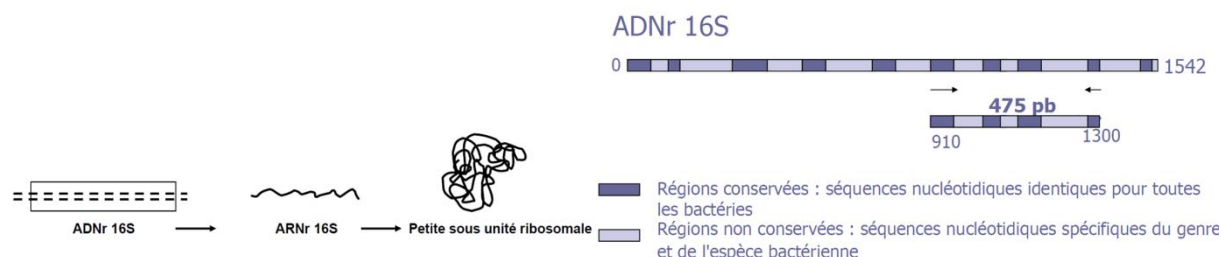


Figure I-24: ADNr 16S et ARNr 16S.

Cependant, si la quantité de matériel génétique présent dans l'échantillon à analyser est trop faible alors, une amplification de celui-ci est nécessaire : c'est la PCR pour « polymerase chain reaction ».

La PCR est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN connue, à partir d'une faible quantité d'acides nucléiques et d'amorces spécifiques constituées d'oligonucléotides de synthèse de 20 à 25 nucléotides. La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température (Annexe 1).

Lorsque le matériel génétique est présent en assez grande quantité, les études de la diversité microbienne peuvent être réalisées par l'application de diverses techniques de biologie moléculaire dont le séquençage de l'ADN.

Le séquençage de l'ADN est une technique consistant à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides composant une séquence d'ADN. Il existe de nombreuses techniques de séquençage mais elles reposent sur le même principe. La synthèse d'un brin complémentaire d'ADN à partir d'un brin matrice via une enzyme particulière, l'ADN polymérase le plus souvent, et à l'aide d'une amorce (oligonucléotide) complémentaire au brin matrice et située en amont de l'ADN à séquencer. Il existe plusieurs méthodes de séquençage. La première à être apparue est la technique de Sanger (Annexe 2) et une des dernières techniques récemment mise au point est celle du pyroséquençage (Annexe 3). Ce sont ces techniques qui ont servi afin de caractériser la diversité microbienne des biofilms marins lors de cette étude.

Bilan des analyses de la diversité

Bactéries et biofilms marins, diversité et distribution

En 2003, sur les 52 phyla bactériens répertoriés (tous environnements confondus) grâce à l'approche de séquençage de l'ADNr 16S, seulement 26 comprenaient des représentants cultivés (Rappe & Giovannoni, 2003). De nos jours, des représentants sont cultivés pour quasiment tous les phylums marins connus, cette réalité est très différente à plus fine échelle phylogénique (espèce, genre voire famille) où la grande majorité de la diversité reste inaccessible en culture.

De grandes avancées ont notamment été rendues possibles par les campagnes d'exploration de la diversité microbienne globale. La diversité microbienne a été explorée profondément à travers les écosystèmes majeurs de l'océan mondial à travers plusieurs travaux et projets :

- l'utilisation de techniques de séquençage à haut débit dans le cadre du métagénome de la mer des Sargasses (Venter et al., 2004),
- le projet GOS «Global Ocean Sampling» (Rusch et al., 2007; Yooseph et al., 2007, 2010),
- l'analyse d'un très grand nombre de séquences courtes (comme les régions variables de l'ADNr 16S) provenant de nombreux échantillons dans le cadre de l'ICoMM «International Census of Marine Microbes» regroupant de nombreuses études de pyroséquençage (Amaral-Zettler et al., 2009; Zinger et al., 2011).

La grande majorité des bactéries marines connues est répartie en une douzaine de phyla avec des différences génétiques très importantes (Figure I-25).

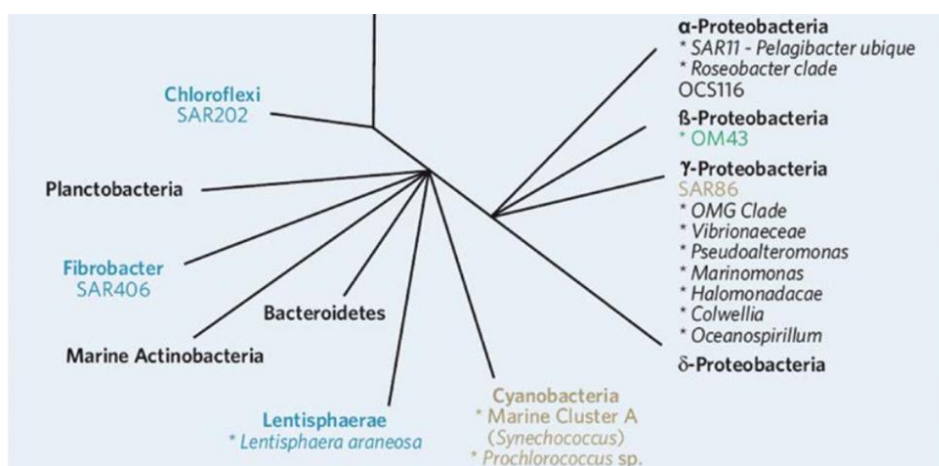


Figure I-25 : Représentation des phyla bactériens en milieu marin.

Avant d'aller plus loin dans l'analyse des résultats concernant la diversité microbienne en milieu marin, il faut savoir que ceux-ci découlent de techniques utilisant la PCR qui peut fournir une vue biaisée de la réalité (Suzuki & Giovannoni, 1996). Plusieurs facteurs, dont le taux de GC (Guanine-Cytosine) contenu l'ADN matrice, peuvent fausser les fréquences relatives des gènes dans les produits de PCR d'échantillons de cultures mixtes.

Les deux classes dominantes (en proportion de séquences ribosomiques) en milieu marin sont les Alphaproteobacteria et les Gammaproteobacteria. De plus, des différences marquées de répartition sont observables, les communautés pélagiques et benthiques ne partagent que peu de taxons. En effet, les communautés benthiques (couche d'eau qui occupe le fond) sont dominées par les Gammaproteobacteria, les Deltaproteobacteria, les Planctomycetes, les Actinobacteria et les Acidobacteria qui sont souvent des taxons possédant des métabolismes particuliers. En revanche, les communautés pélagiques (la partie des mers ou océans comprenant la colonne d'eau, c'est-à-dire les parties autres que les côtes ou le fond marin) sont dominées par les Alphaproteobacteria, les Cyanobacteria et les Bacteroidetes (en particulier les Flavobacteria).

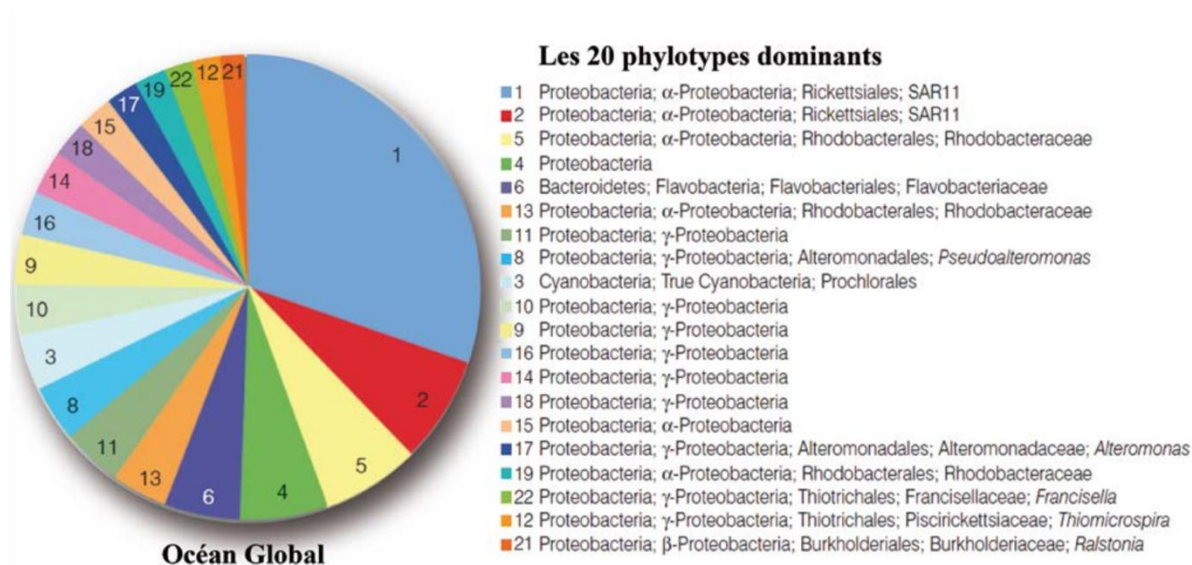


Figure I-26 : Diagramme des 20 phylotypes bactériens les plus abondants obtenus par pyroséquençage dans l'océan (projet ICoMM).

Globalement, les Alphaproteobacteria marines représentent 43,1 % des séquences d'ADNr 16S du GOS (Biers et al., 2009). Parmi elles sont dominants, le groupe des SAR11 et les Rhodobacterales (principalement le genre *Roseobacter*). La dominance des SAR11, qui sont incultivables, dans l'océan mondial a été confirmée par les études globales utilisant le séquençage à haut débit. Elle est estimée à 37 ± 21 % du total de séquences identifiées au niveau taxonomique de la famille dans le projet de pyroséquençage ICoMM (Figure I-26) (Amaral-Zettler et al., 2009; Zinger et al., 2011). À l'inverse parmi les groupes d'Alphaproteobacteria abondants, les Rhodobacterales, et principalement le genre *Roseobacter*, est un groupe avec de nombreux représentants cultivés, notamment sur milieux riches (Brinkhoff et al., 2008).

Dans les données du GOS, les Gammaproteobacteria marines représentent globalement 17,3 % des séquences totales d'ADNr 16S (Biers et al., 2009), dans les données de l'ICoMM elles représentent globalement $25 \pm 14,6$ % (Zinger et al., 2011). De nombreux groupes de Gammaproteobacteria marines sont actuellement cultivés (Fuhrman & Hagström, 2008) dont les plus connus sont les Vibrionaceae et les Alteromonadaceae.

Le groupe des Bacteroidetes, anciennement connu comme le groupe des Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroidetes, est également une composante importante du bactérioplancton. Ce groupe représente le plus souvent le troisième groupe le plus abondant dans les banques de clones après les Alphaproteobacteria et les Gammaproteobacteria (Pommier et al., 2007). Dans les données de pyroséquençage, les séquences flavobactériennes représentent $17 \pm 12,5$ % des séquences totales d'ARNr 16S retrouvées en milieu côtier dans l'ICoMM (Zinger et al., 2011). Les Flavobacteriaceae présentent une grande capacité de colonisation des surfaces inertes et vivantes (Bowman, 2006).

Concernant les biofilms en milieu marin, la diversité microbienne les composants sont similaires à la diversité microbienne évaluée dans l'eau de mer. Ainsi, une étude de la diversité microbienne sur les biofilms marins de la Grande barrière de corail australienne réalisée par différentes techniques dont le FISH et la DGGE montre la présence des mêmes

classes et phyla mis en évidence dans l'eau de mer tels que les Alpha- et Gammaproteobacteria et Bacteroidetes (Kriwy & Uthicke, 2011). Si l'on fait un « zoom » sur les genres bactériens, alors *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Acinetobacter* sont les plus rencontrés dans le milieu marin, en particulier dans les biofilms.

Diversité microbienne des biofilms formés sur des biocathodes

Seules quelques études ont exploré la composition microbienne des biofilms formés sur les biocathodes en milieu marin grâce à des techniques de biologie moléculaire.

Ainsi, le biofilm formé en surface d'une biocathode en acier inoxydable polarisée à - 0,2 V/Ag-AgCl en eau de mer naturelle a été analysée par culture puis par séquençage de l'ADNr 16S et par DGGE (Vandecastelaere et al., 2010). La première technique montre la présence sur l'électrode d'Alpha- et Gammaproteobacteria (classe), de Firmicutes (phylum), de Flavobacteriaceae (famille appartenant au phylum Bacteroidetes) et des Actinobacteria (phylum). La technique de DGGE, elle, a permis de montrer que l'eau de mer environnant l'électrode contient les mêmes membres dominants que pour le biofilm cathodique.

La même année, une autre étude ayant également pour but d'identifier les microorganismes présents sur les biocathodes en acier inoxydable polarisées à - 0,2 V/Ag-AgCl en milieu marin a été réalisée (Erable et al., 2010). L'identification, par culture suivie d'un séquençage de l'ADNr 16S, a révélé des résultats très similaires à l'étude précédente, le biofilm étant composé d'Alpha- et Gammaproteobacteria, de Firmicutes, d'Actinobacteria et de Flavobacteriaceae.

Une étude a été réalisée en utilisant uniquement la technique de DGGE afin de comparer les populations présentes sur des biocathodes formées en eau de mer mais dans des conditions différentes (Faimali et al., 2010). Les résultats de l'analyse des biofilms par DGGE montrent que la similarité entre les populations microbiennes, formées dans des conditions expérimentales différentes (différents volumes, températures, techniques électrochimiques ou flux d'eau de mer), est faible (environ 10%). Ces résultats mettent en évidence la forte variabilité génétique entre ces populations bactériennes et leur capacité d'adaptation rapide à des conditions différentes, soulignant une fois de plus la difficulté de trouver une corrélation entre l'activité électrochimique et la composition des populations microbiennes. Ces variations semblent contraster avec les études sur la diversité microbienne des biocathodes en milieu marin citées précédemment où la diversité microbienne était relativement similaire. Mais, il faut tenir compte que les similarités de diversité microbienne se situent au niveau du phylum voire de la famille, cela ne signifie pas que cela soit le cas lorsque l'on s'intéresse au niveau des genres et des espèces bactériennes.

I.4) *Lactococcus lactis* : bactérie électroactive à coloration de Gram positive

Les bactéries « modèles » dont les mécanismes de transfert d'électrons sont les plus étudiés sont des bactéries à coloration de Gram négative telles que *Geobacter* et *Shewanella*. Or, quelques études ont également montré que les bactéries à coloration de Gram positive sont également capables d'échanger des électrons avec une électrode. Lors de nos travaux, nous avons étudié l'électroactivité d'une bactérie à coloration de Gram positive, *Lactococcus lactis*. Cette souche a été très étudiée du fait de son implication dans l'industrie laitière et son métabolisme est donc relativement bien connu. Cette connaissance au niveau métabolique

pourrait être un avantage certain dans notre recherche de compréhension des mécanismes de transfert électronique lors des expérimentations électrochimiques.

I.4.1) *Lactococcus lactis* : un modèle de bactérie lactique

En 1919, les bactéries lactiques sont définies comme un groupe de bactéries à coloration de Gram positive, non sporulantes et possédant un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique...) (Orla-Jensen, 1919). Elles sont également anaérobies mais aérotolérantes et ne possèdent aucune catalase. *Lactococcus lactis* est l'une des bactéries lactiques les plus étudiées. En effet, c'est une bactérie modèle pour la recherche fondamentale et qui est depuis plusieurs décennies l'objet de très nombreuses études. C'est aussi la première bactérie lactique dont le génome a été entièrement séquencé (Bolotin et al., 2001). La disponibilité de ses séquences génomiques et plasmidiques fait de ce microorganisme un modèle pour l'étude du métabolisme des bactéries lactiques ainsi que de leur comportement face à différents stress. L'environnement naturel de *Lactococcus lactis* est généralement le lait mais on peut également les isoler des plantes. Le milieu laitier est souvent très riche en constituants nutritifs. Cette richesse nutritive a conduit *Lactococcus lactis* à perdre peu à peu de nombreuses voies métaboliques du fait de l'absence de pressions de sélection. Par conséquent cette espèce présente de nombreuses auxotrophies (incapacité d'un organisme vivant à synthétiser un composé organique nécessaire à son développement) et de fortes exigences nutritionnelles, notamment en ce qui concerne les acides aminés et les vitamines. Les auxotrophies de *Lactococcus lactis* se situent entre 7 et 12 selon les souches. La sous espèce *lactis* n'exige que 7 acides aminés : leucine, valine, isoleucine, histidine, méthionine, arginine et glutamine (Foucaud et al., 2001).

I.4.1.a) *Lactococcus lactis* : métabolisme des sucres par fermentation

Métabolisme du glucose : la glycolyse

Une fois transporté à l'intérieur de la cellule, le glucose est immédiatement phosphorylé (soit par le système PTS, soit par la glucokinase) en glucose-6-phosphate (G6P). Puis il rejoint la voie centrale du catabolisme des sucres : la glycolyse où une succession de réactions conduit à la formation de pyruvate (Figure I-27). Le bilan énergétique de la glycolyse est de 2 moles d'ATP et 2 moles de NADH produites par mole de glucose consommée.

En aval du pyruvate : métabolisme homolactique ou métabolisme mixte

La glycolyse génère de l'ATP qui est indispensable aux voies de biosynthèse, mais aussi du NADH. Afin de rétablir la balance de pouvoir réducteur (NADH/NAD⁺) le pyruvate, situé au carrefour de nombreuses voies métaboliques, doit être oxydé. Chez *Lactococcus lactis*, le glucose emprunte la voie homofermentaire, et le pyruvate est transformé pour conduire soit au métabolisme homolactique, soit à un métabolisme mixte (Figure I-27) (CocaignBousquet et al., 1996). Les lactocoques sont considérés comme des microorganismes homolactiques puisque, généralement, ils convertissent plus de 90 % du pyruvate produit en acide lactique. A la sortie de la glycolyse, la lactate-déshydrogénase (LDH) convertit le pyruvate en lactate et régénère 2 moles de NAD⁺ par mole de glucose. L'activité de la LDH permet ainsi de rééquilibrer le bilan d'oxydoréduction (Neves et al., 2005).

Certaines conditions de fermentation, comme l'aérobiose, (Condon, 1987) induisent le basculement du métabolisme vers les voies fermentaires mixtes. Au cours du métabolisme mixte, les sucres qui empruntent la glycolyse continuent à générer du pyruvate mais le flux à travers la LDH est fortement diminué. Le pyruvate est alors métabolisé par la pyruvate formiate lyase (PFL) (anaérobiose) ou la pyruvate déshydrogénase (PDH) (aérobiose) en acétyl-CoA avec formation respectivement, de formiate ou de CO_2 (Figure I-27) (CocaignBousquet et al., 1996; Neves et al., 2005). La métabolisation de l'acétyl-CoA implique soit la phosphotransacétylase (PTA) et l'acétate kinase (ACK) avec formation d'acétate, soit l'alcool déshydrogénase (ADHE) avec production d'éthanol. La voie de l'éthanol produit 2 moles de NAD^+ alors que la voie de l'acétate produit 1 mole d'ATP. L'équilibre d'oxydoréduction (régénération de NAD^+) détermine la stœchiométrie des produits de la fermentation mixte (Garrigues et al., 1997; Neves et al., 2005). Le bilan énergétique de la fermentation mixte est amélioré par rapport à la voie homolactique puisque la synthèse d'acétate permet de produire un ATP supplémentaire.

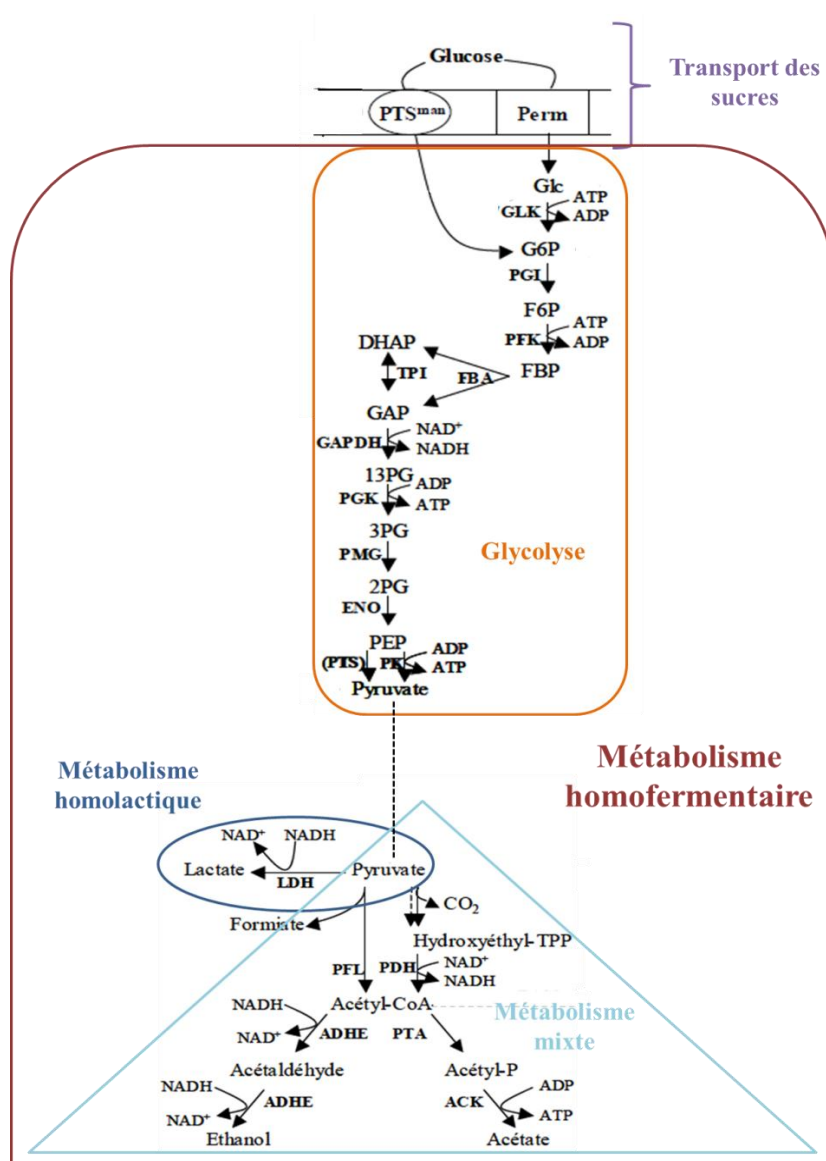


Figure I-27: Représentation schématique du métabolisme homofermentaire comprenant la glycolyse suivie des voies des métabolismes homolactique et mixte.

Régulation du métabolisme des sucres

Lactococcus lactis montre généralement un métabolisme homolactique mais sous certaines conditions, comme dans le cas d'une limitation en glucose (Even et al., 2001) le métabolisme bascule vers la fermentation mixte. En anaérobiose et avec un flux glycolytique faible, le pyruvate est pris en charge, en plus de la LDH, par la PFL et le métabolisme s'oriente vers les voies de fermentation mixtes avec production de lactate, formiate, acétate et éthanol. De plus, l'orientation du métabolisme vers la fermentation mixte peut être induite par l'environnement gazeux, c'est-à-dire par la présence de dioxygène (Papagianni et al., 2007) (voir I.4.2.d) Métabolisme aérobie).

I.4.1.b) *Lactococcus lactis* : métabolisme aérobie

Métabolisme aérobie

Lactococcus lactis est dite microaérophile et dans certaines conditions cette bactérie peut tolérer et même utiliser le dioxygène (Duwat et al., 2001). La présence de dioxygène induit l'activité NADH oxydase qui ré-oxyde NADH en NAD^+ et par conséquent fait baisser le ratio NADH/NAD^+ (Jensen et al., 2001). Lorsque le ratio NADH/NAD^+ est faible, l'activité de la LDH diminue alors que l'activité de la PDH augmente (Jensen et al., 2001). Par ailleurs la présence de dioxygène inactive la PFL (Melchiorson et al., 2000). Dans ces conditions, en fonction de la quantité de dioxygène et de l'équilibre d'oxydoréduction, le métabolisme bascule de la fermentation homolactique vers la fermentation mixte avec production de lactate, d'acétate et de CO_2 (Neves et al., 2005; Papagianni et al., 2007).

Stress oxydant

La présence de dioxygène contribue au basculement du métabolisme vers la fermentation mixte mais le dioxygène est aussi un agent toxique impliqué dans le vieillissement et la mortalité cellulaire (Berlett & Stadtman, 1997). Certaines réactions du métabolisme réduisent partiellement le dioxygène menant à la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), comme le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH^\cdot) et l'eau oxygénée (H_2O_2). Ces ROS ont un potentiel d'oxydation élevé et sont responsables de la toxicité en altérant les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Cabiscol et al., 2000). Pour se défendre contre le stress oxydant *Lactococcus lactis* possède diverses stratégies.

En premier lieu, l'activité NADH oxydase oxyde le NADH en NAD^+ , en réduisant le dioxygène en H_2O_2 (NADH oxydase de type I) ou H_2O (NADH oxydase de type II). De plus, *Lactococcus lactis* possède une superoxyde-dismutase (Sod) unique qui réduit les radicaux O_2^- en H_2O_2 , diminuant ainsi la toxicité (Sanders et al., 1995). En cas de faible activité de la Sod, l'accumulation de glutathione intracellulaire pourrait être un mécanisme alternatif pour détoxifier la cellule en éliminant les radicaux O_2^- . En effet, la forte concentration en glutathione active la glutathione réductase, responsable de la réduction de H_2O_2 (Li et al., 2003). *Lactococcus* est dépourvue de catalase mais l' H_2O_2 peut être réduit par la NADH peroxydase conduisant à la formation d'eau (Miyoshi et al., 2003). Cependant, l'activité de la NADH peroxydase est faible chez *Lactococcus lactis* et la détoxification du H_2O_2 cellulaire par cette enzyme est inefficace. Lorsque le flux glycolytique est fort, chez *Lactococcus lactis* ATCC19435 (déficiente en NADH peroxydase et en superoxyde dismutase), le pyruvate réagit avec H_2O_2 pour former de l'eau et de l'acétate (van Niel et al., 2002), fournissant ainsi à la cellule un mécanisme alternatif de protection contre l' H_2O_2 .

Respiration

Les lactocoques peuvent mettre en place un métabolisme respiratoire sous certaines conditions environnementales.

L'apport d'hème, une molécule de porphyrine contenant des ions de fer ferrique qui permet de fixer le dioxygène, est indispensable pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire de *Lactococcus lactis*, même si l'aération est potentiellement suffisante (Duwat et al., 2001; Gaudu et al., 2002). En effet, les systèmes d'import de porphyrine et de fer sont présents chez *Lactococcus lactis* mais une partie seulement de la voie de biosynthèse d'hème est active (Duwat et al., 2001). A l'exception de la voie de synthèse d'hème, tous les éléments de la chaîne respiratoire sont présents chez *Lactococcus lactis*: des NADH déshydrogénases, des enzymes de synthèse de ménaquinones, et de cytochrome oxydases. L'activité de tous ces éléments a pu être démontrée durant la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance en présence d'hème et de dioxygène.

La respiration, en réduisant le niveau d'oxydation intracellulaire, améliore la survie cellulaire et le rendement en biomasse en comparaison de la croissance fermentaire en condition statique ou en condition d'aération (Duwat et al., 2001). Par ailleurs, le lactate s'accumule moins au profit de la production de CO₂, et le pH reste élevé (Gaudu et al., 2002). La respiration conduit donc aussi à éviter le stress acide (Rezaiki et al., 2004).

I.4.2) *Lactococcus lactis* : formation de biofilm

En 1999, une publication fait état de la formation d'un biofilm sur de l'acier inoxydable par *Lactococcus lactis* (Leriche et al., 1999). *Lactococcus lactis* est donc capable de former des biofilms monospèces sur un support solide. Par la suite, seules quelques études se sont intéressées à la structure du biofilm de *Lactococcus lactis* et aux facteurs impliqués dans la formation de celui-ci. En 2002, un premier facteur impliqué dans la formation de biofilms par *Lactococcus lactis* a été mis en évidence : les cassures de peptidoglycane (Mercier et al., 2002). Les bactéries à coloration de Gram positive ont une paroi cellulaire composée essentiellement de peptidoglycane (Figure I-28). Il a été montré que ces cassures, qui interviennent naturellement tout au long de la vie cellulaire, jouent un rôle dans la formation du biofilm. En effet, les cellules déficientes en peptidoglycane hydrolase, enzyme assurant les cassures du peptidoglycane, adhèrent moins efficacement à une surface solide que les cellules possédant cette enzyme.

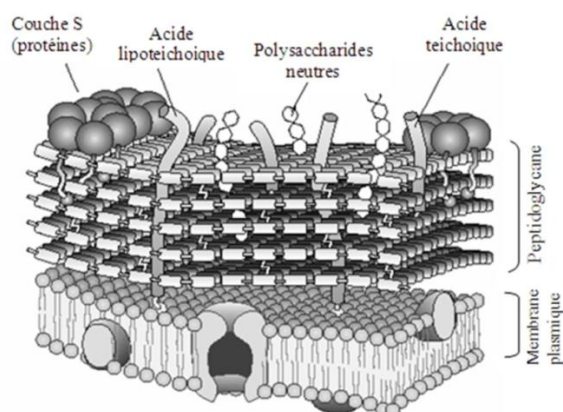


Figure I-28 : Schéma représentant la paroi des bactéries à coloration de Gram positive (Delcour et al., 1999).

Un autre facteur clé de la formation de biofilm par *Lactococcus lactis* est le système de conjugaison à haute fréquence (Luo et al., 2005). La conjugaison est une des méthodes employées par les bactéries pour s'échanger du matériel génétique (c'est du transfert de gènes horizontal). Afin que ces transferts puissent s'effectuer il est préférable et même indispensable que les bactéries soient proches les unes des autres, il est alors logique de penser que le biofilm est un environnement adéquat pour ces transferts. Par différentes techniques de caractérisation de l'adhésion et de la structure du biofilm (test d'adhésion rapide en microplaque et microscopie confocale à balayage laser), il a été montré que les cellules en possession d'un système de conjugaison à haute fréquence (CluA) ont des meilleures capacités d'agrégation et de formation de biofilm.

Le dernier acteur influençant la formation de biofilms implique un appendice extracellulaire : les pili. En 2012, une équipe du laboratoire MICALIS, a démontré l'importance des pili dans la structuration du biofilm de *Lactococcus lactis* (Oxaran et al., 2012). Le travail a été réalisé à partir d'une souche de *Lactococcus lactis* IL1403 ne présentant pas de pili à sa surface bien que possédant un opéron (ensemble de gènes) permettant la synthèse des pili. Cette absence de pili est due au promoteur en amont de l'opéron appelé opéron *pil*. En effet, le promoteur ne permet qu'une faible expression de l'opéron *pil*. La souche IL1403 a été modifiée avec l'insertion d'un plasmide (pPil) comportant l'opéron *pil* mais doté d'un promoteur efficace. L'opéron plasmidique est alors sous le contrôle d'un promoteur constitutif et la souche ainsi créée est nommée *Lactococcus lactis* IL1403 pPil. Les pili de cette souche ont pu être visualisés par imagerie en AFM. La microscopie confocale à balayage laser, elle, a permis de constater que la souche IL1403 pPil forme des biofilms plus épais et aérés que ceux de la souche IL1403.

I.4.3) Propriétés électrochimiques de *Lactococcus lactis*

I.4.3.a) Propriétés électrochimiques des bactéries à coloration de Gram positive

Jusqu'à présent la grande majorité des bactéries décrites comme électroactives sont des bactéries à coloration de Gram négative. Contrairement aux bactéries à coloration de Gram négative, les bactéries à coloration de Gram positive ne possèdent pas de membrane externe riche en protéines. Elles sont donc exclues des théories actuelles concernant le transfert direct d'électrons supposant une localisation des systèmes de transport d'électrons sur la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative (Lovley, 2008). Ainsi, l'absence de membrane externe chez les bactéries à coloration de Gram positive laissait à penser que, jusqu'à présent, les bactéries à coloration de Gram positive avaient un rôle secondaire au sein des communautés microbiennes électroactives (Rabaey et al., 2007).

En complément, à la place d'une membrane externe, les bactéries à coloration de Gram positive possèdent une paroi beaucoup plus épaisse formée essentiellement de peptidoglycane, qui, selon certains chercheurs, pourrait être une barrière au transfert direct d'électrons entre la bactérie et une électrode (Pham et al., 2008). La structure ainsi que la composition de leur paroi expliquent certainement le peu de travaux rapportés dans la littérature sur l'étude de ce type de bactéries dans des systèmes bioélectrochimiques. Pourtant quelques études montrent que des bactéries à coloration de Gram positive ont la possibilité d'échanger, directement ou non, des électrons avec une électrode et de générer du courant électrique.

Par l'intermédiaire d'un médiateur soluble exogène, deux études montrent l'obtention d'un courant électrique par des microorganismes à coloration de Gram positive. En présence

d'acides humiques et d'une cathode en graphite, *Desulfitobacterium hafniense* est capable de générer du courant (400 mW.m^{-2}) dans une pile à combustible microbienne (Milliken & May, 2007). De même, une souche de *Brevibacillus* peut transférer des électrons à une électrode en utilisant comme médiateur des phénazines (pigments produits par *Pseudomonas aeruginosa*) (Pham et al., 2008). D'autres bactéries à coloration de Gram positive produisent leurs propres médiateurs redox. Ce type de transfert par des médiateurs endogènes a été observé chez *Bacillus subtilis* qui a produit $1,05 \text{ mW.cm}^{-2}$ dans le compartiment anodique d'une pile à combustible microbienne (Nimje et al., 2009). Après une étape de centrifugation, c'est en comparant les activités du surnageant et des bactéries remises en suspension par voltammétrie cyclique que les auteurs ont montré l'implication de médiateurs excrétés par les bactéries dans le transfert d'électrons. De même, en utilisant des médiateurs endogènes, une souche de *Corynebacterium* testée sous des conditions alcalines, pH 9, permet d'atteindre des densités de puissance de $7,3 \text{ mW.m}^{-2}$ (Liu.M et al., 2010).

Les bactéries à coloration de Gram positive : *Clostridium butyricum* (Park et al., 2001), *Clostridium isatidis* (Compton et al., 2000) et *Thermincola ferriacetica* (Marshall & May, 2009) sont capables d'utiliser directement par contact une électrode comme accepteur d'électrons.

En conclusion, même si pour l'instant leur nombre est inférieur à celui des bactéries à coloration de Gram négative, les bactéries à coloration de Gram positive sont également capables de catalyser des réactions d'oxydoréduction au contact d'électrodes.

I.4.3.b) Propriétés électrochimiques de *Lactococcus lactis*

Comme d'autres bactéries lactiques, *Lactococcus lactis* produit des quantités significatives de quinones liées à la membrane, pour la plupart ce sont des ménaquinones (dérivés de la vitamine K2) : la 1,4-naphtoquinone. Les ménaquinones liées à la membrane sont responsables de la capacité de *Lactococcus lactis* à réduire les métaux (Fe^{3+} et Cu^{2+}) et le dioxygène (Rezaiki et al., 2008).

Des travaux antérieurs ont également montré que *Lactococcus lactis* peut exploiter une quinone exogène soluble : le 2-amino-3-dicarboxy-1,4-naphtoquinone (ACNQ) pour la réduction de l'hexacyanoferrate, qui s'accompagne d'un changement métabolique conduisant à la production d'acétate (Yamazaki et al., 2002). Il a également été montré que ce changement métabolique qui avait été précédemment observé pour cette espèce à cause de la présence d'accepteurs d'électrons tels que l'hexacyanoferrate, le citrate ferrique, le chlorure cuivrique et de l'oxygène est également déclenché par la présence d'une anode polarisée comme accepteur d'électrons extracellulaire insoluble (Freguia et al., 2009). En effet, *Lactococcus lactis* est capable de produire et de sécréter elle-même l'ACNQ, qui sert de médiateur redox entre la cellule bactérienne et l'électrode (Figure I-29). Au cours de l'expérimentation électrochimique se met en place un nouveau métabolisme (métabolisme mixte à la place du métabolisme homolactique) où un petit pourcentage d'électrons provenant du catabolisme du glucose est dévié pour la production d'électricité et d'acétate (Figure I-29). La densité de courant maximale obtenue avec un pulse de glucose de 5 mM est de 30 mA.m^{-2} avec un potentiel imposé à l'anode de + 0,1 V/ESH.

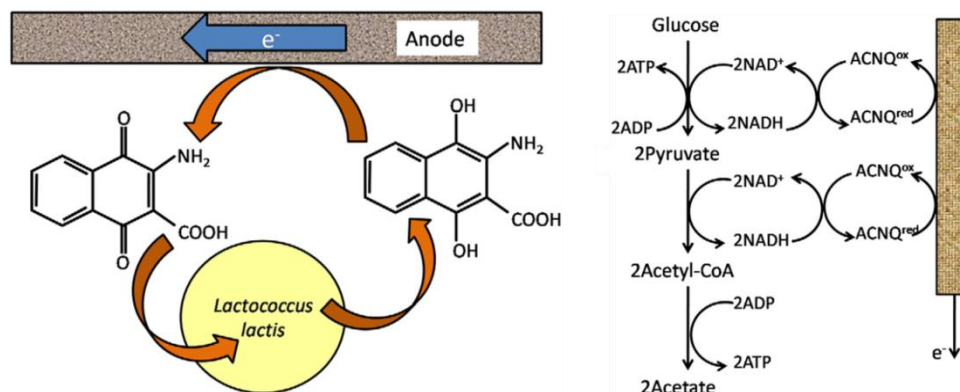


Figure I-29 : (Gauche) : Mécanisme de transfert d'électrons entre *Lactococcus lactis* et l'anode polarisée. L'ACNQ est excrétée en tant que médiateur sous sa forme réduite et est réoxydée à la surface de l'électrode. Par la suite, elle est reprise par la bactérie et réduite par voie enzymatique à partir de NADH. (Droite) : Voie de fermentation électrochimiquement modifiée de *Lactococcus lactis*. (Freguia et al., 2009).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II.1) Réacteurs bioélectrochimiques à trois électrodes

Les expériences sur les biofilms électroactifs ont été réalisées dans des bioréacteurs électrochimiques équipés de montages électrochimiques à 3 électrodes (Figure II-30). Le système à trois électrodes est composé d'une électrode de travail, d'une électrode de référence et d'une contre-électrode.

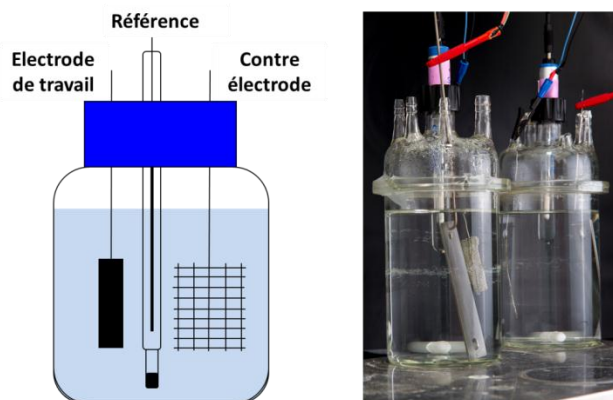


Figure II-30: Représentation schématique (à gauche) et illustration photographique (à droite) des réacteurs bioélectrochimiques à trois électrodes.

Le bioréacteur d'une contenance de 500 mL est fermé par un bouchon à quatre orifices étanches. Ces orifices permettent le passage des connexions électriques des électrodes dans le réacteur. Le nombre d'électrodes étant de trois, le dernier orifice peut être utilisé pour apporter un gaz dans le réacteur (air, dioxygène, N_2 ,...), ajouter des compléments au milieu, faire des prélèvements ou passer des sondes pour des mesures de pH ou de dioxygène dissous. Selon les expériences, un barreau aimanté est ajouté dans le réacteur pour travailler sous agitation. Les réacteurs, au cours des expérimentations, ont été immergés dans un bain thermostaté à 30°C.

II.1.1) Les électrodes

II.1.1.a) L'électrode de référence

L'électrode de référence utilisée est une électrode commerciale au calomel ($HgCl_{2(s)}$) saturée (ECS, Radiometer) (Figure II-31). En dehors des périodes d'expérimentation, les électrodes de référence ont été conservées dans une solution de KCl saturée.

Avant chaque expérience électrochimique le potentiel des électrodes de référence est contrôlé afin de s'assurer de leur bon fonctionnement. Pour cela, l'électrode de référence à tester ainsi qu'une autre électrode de référence (référence neuve jamais utilisée en expérimentation) sont plongées dans une solution de NaCl à 10 g.L⁻¹ puis branchées aux bornes d'un voltmètre. Toute électrode de référence dont la différence de potentiel est supérieure à 10 mV est considérée comme impropre. Une décontamination à l'alcool a été effectuée avant chaque utilisation.

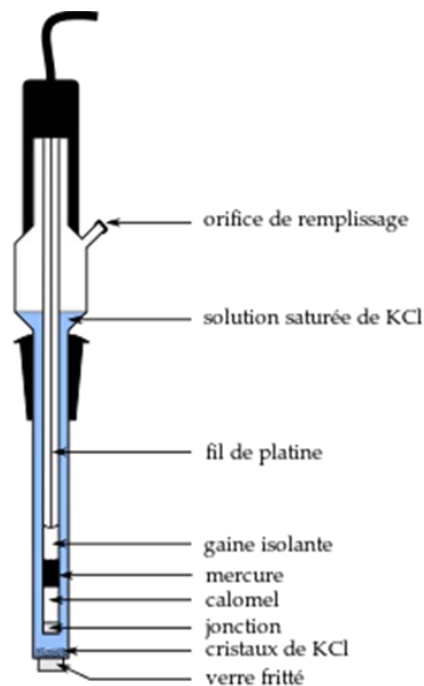


Figure II-31 : Représentation schématique d'une électrode de référence au calomel saturée.

II.1.1.b) La contre électrode

Les contre-électrodes sont des grilles de platine de 4 cm² (Pt/Ir 90 %/10 %, référence 81031162, Heraeus). La contre-électrode en grille de platine est connectée au circuit électrique par un fil de platine. Avant toute utilisation, la contre-électrode de platine (Figure II-37 C) a été stérilisée et dépolluée à la flamme d'un bec Bunsen.

II.1.1.c) Les électrodes de travail

Le matériau d'électrode de travail utilisé pour les travaux en milieu eau de mer avec les bactéries marines est l'acier inoxydable 254SMO. Pour les tests électrochimiques effectués avec *Lactococcus lactis*, l'électrode de travail est faite de tissu de carbone.

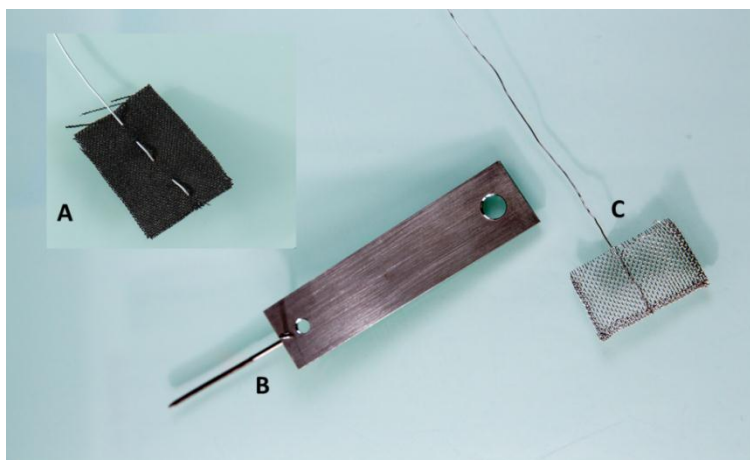


Figure II-32 : (A) Electrode de travail en tissu de carbone ; (B) électrode de travail en acier inoxydable 254SMO et (C) contre électrode en platine.

L'acier inoxydable 254SMO et traitements

Selon la norme UNS (Unified Numbering System) l'acier inoxydable 254SMO est un acier de type UNS S31254, un acier austénique dont la composition est présentée dans le [Tableau II-4](#).

Tableau II-4 : Composition de l'acier inoxydable 254SMO.

254SMO® - UNS S31254		
Elément	Symbole	Maximum (%)
Chrome	Cr	19,5 – 20,5
Nickel	Ni	17,5 – 18,5
Molybdène	Mo	6,0 – 6,5
Manganèse	Mn	1,0
Cuivre	Cu	0,50 – 1,00
Silice	Si	0,80
Azote	N	0,18 – 0,22
Phosphore	P	0,030
Carbone	C	0,020
Sulfure	S	0,015

La connexion électrique est assurée avec une tige de titane (diamètre 2 mm, Alfa Aesar) filetée et vissée dans l'électrode ([Figure II-32 B](#)).

Avant leur utilisation, les électrodes en acier inoxydable ont été nettoyées dans une solution 50/50 (v/v) d'acétone/éthanol sous agitation pendant 20 minutes puis rincées à l'eau pendant 10 minutes. Ce premier traitement permet de dissoudre d'éventuels composés organiques adsorbés. Elles ont ensuite été traitées pendant 20 minutes dans une solution d'acide fluorhydrique (HF) à 2 % et d'acide nitrique 20 % (HNO₃) et enfin rincées à l'eau pendant 10 minutes. Ce dernier traitement permet d'éliminer la couche de passivation qui se forme en surface de l'acier. Les électrodes ont été utilisées immédiatement après le nettoyage.

Le tissu de carbone

Les électrodes en tissu de carbone ont été fournies par Paxi Tech SAS (Grenoble). Les dimensions des électrodes étaient généralement de 30 x 20 mm (6 cm²) avec une épaisseur de 2 mm. Elles ont été utilisées sans traitement préliminaire.

La connexion électrique est assurée par un fil de platine (diamètre 1 mm) qui traverse le tissu de carbone dans le sens de la longueur ([Figure II-32 A](#)).

II.1.2) Les techniques électrochimiques

Trois techniques électrochimiques ont été utilisées au cours de ce travail : la chronoampérométrie, la voltammétrie cyclique et la voltammétrie à impulsion différentielle. L'ensemble de ces mesures électrochimiques a été réalisé avec un multi-potentiostat (VPM, Bio-Logic S.A., France) piloté par le logiciel EC-Lab (version 10.2).

II.1.2.a) La chronoampérométrie

La chronoampérométrie (CA) consiste à imposer un potentiel constant à l'électrode de travail versus l'électrode de référence et à enregistrer la réponse en courant au cours du temps (Figure II-33). Afin de comparer les résultats, les courants enregistrés sont présentés en densité de courant (I) en mA.m^{-2} . La surface prise en compte pour le calcul de densité de courant est la surface géométrique de la face de l'électrode exposée à la contre électrode, quel que soit le matériau, sa porosité et son épaisseur.

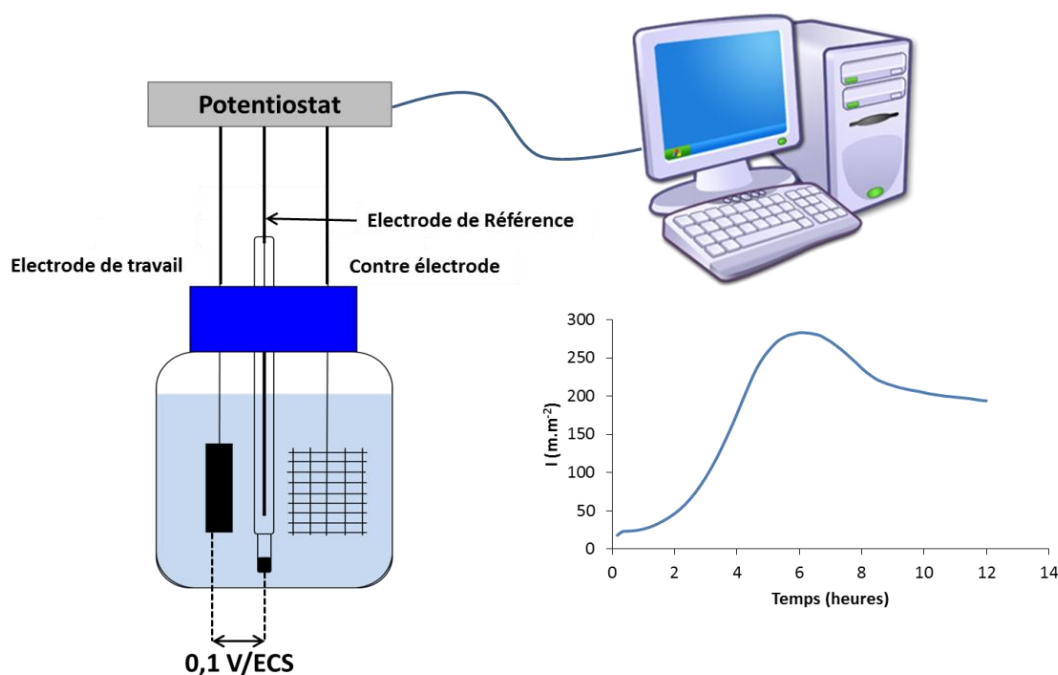


Figure II-33 : Représentation schématique du dispositif de chronoampérométrie.

II.1.2.b) La voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (cyclic voltammetry, CV) consiste à enregistrer le courant pendant que le potentiel de l'électrode de travail varie linéairement au cours du temps en effectuant des allers-retours entre deux valeurs limites. Pendant le balayage de potentiel, le potentiostat mesure le courant résultant des réactions électrochimiques d'oxydation et de réduction qui se produisent à la surface de l'électrode (Figure II-34). Par convention, les courants d'oxydation sont représentés positivement et les courants de réduction négativement.

La vitesse de balayage du potentiel est le plus souvent constante. Ici les CV ont été réalisées avec des vitesses de 1 à 100 mV.s^{-1} , au cours des chronoampérométries stoppant temporairement l'application du potentiel constant de la CA.

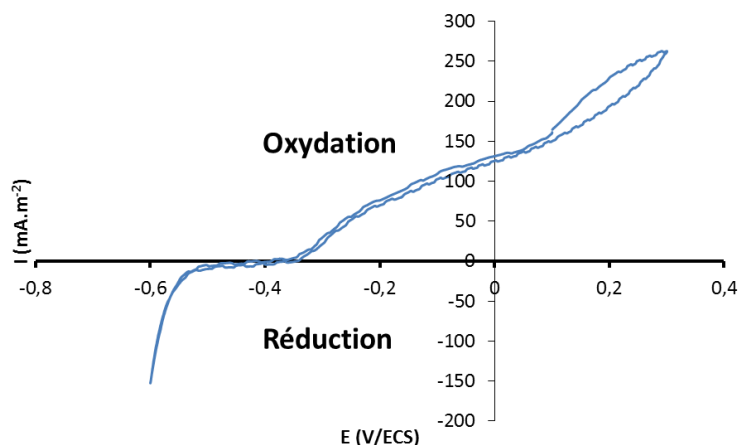


Figure II-34 : Exemple d'un voltammogramme cyclique, vitesse de balayage de $0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

II.1.2.c) La voltammétrie à impulsion différentielle

La voltammétrie à impulsion différentielle (DPV : Differential Pulse Voltammetry) est une technique très utile en analyse. Les mesures différentielles permettent la discrimination des courants faradiques et capacitifs.

Le courant faradique résulte des réactions d'oxydoréduction des analytes à l'interface électrode/solution et constitue donc la composante importante dans l'analyse quantitative de ces éléments. Il peut être influencé par les cinétiques de différents processus :

- la cinétique de transfert de masse des analytes électroactifs au sein de la solution vers les électrodes
- la cinétique de transfert d'électrons à l'interface électrode/solution
- la cinétique des réactions chimiques qui précèdent ou qui suivent le transfert d'électrons.

Le courant capacitif, lui, est dû à la charge à l'interface entre la couche de surface de l'électrode et la couche de la solution adjacente et est représenté par un condensateur. Le courant capacitif dépend de la surface de l'électrode, de la vitesse de variation du potentiel avec le temps, de la composition du milieu mais pas de la concentration de l'analyte.

Les techniques à tension pulsée permettent d'augmenter le rapport courant faradique/courant capacitif, et ainsi la sensibilité de détection. En effet, après un changement instantané du potentiel, la décroissance du courant capacitif a lieu plus rapidement que celle du courant faradique. En voltammétrie à impulsion différentielle (Figure II-35), une impulsion rectangulaire d'amplitude $|\Delta E|$ et de durée Δt est superposée sur chaque marche, de hauteur $|\Delta E_s|$ et de durée $\Delta t_1 + \Delta t$, d'un escalier de potentiel. L'impulsion aboutit à la fin de la marche de l'escalier et $\Delta t_1 > \Delta t$.

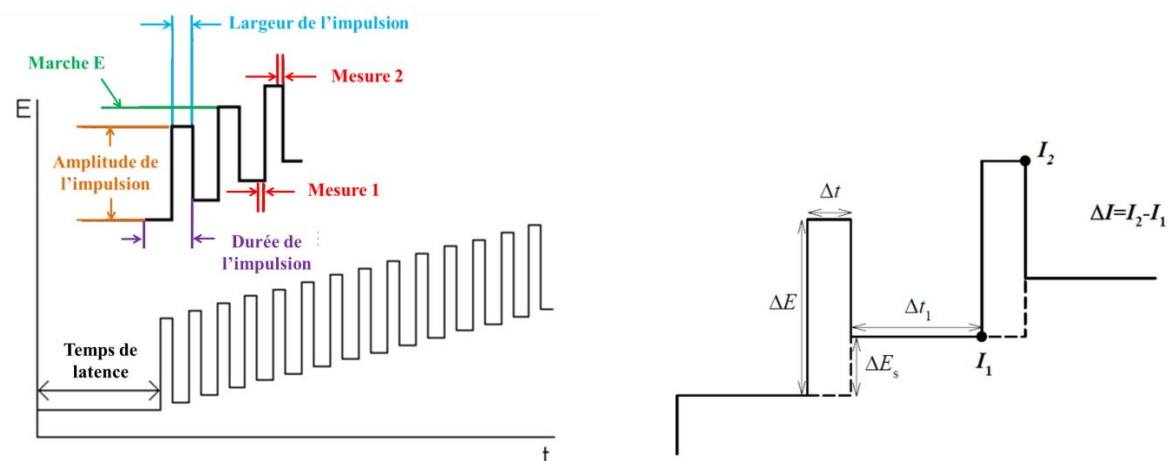


Figure II-35 : Représentation schématique de la forme d'onde imposée du potentiel en voltammétrie à impulsion différentielle.

Le courant est échantillonné juste avant et à proximité de la fin de l'impulsion. Le courant différentiel (ΔI) qui en résulte est la différence entre ces deux courants. La hauteur du pic de courant (I_p) est ainsi directement liée à la concentration de l'espèce électroactive dans la cellule électrochimique (Figure II-36). Ce pic de courant est enregistré au potentiel de demi-vague observé en voltammétrie linéaire pour la même réaction.

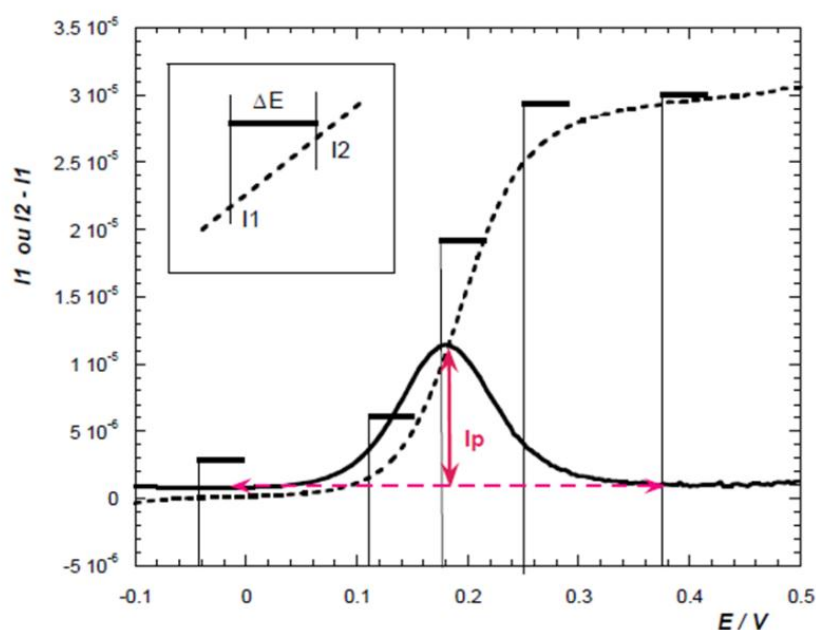


Figure II-36 : Comparaisons des résultats entre voltammétrie linéaire (trait pointillé) et voltammétrie à impulsion différentielle (trait plein).

Les paramètres utilisés lors des expérimentations sont une amplitude de 50 mV, une durée/largeur du pulse de 300 ms, une hauteur de step de 2 mV, une durée du step 500 ms et donc un « scan rate » de 4 mV.s^{-1} .

II.2) Etude de bactéries marines

II.2.1) Milieux de culture des bactéries marines

II.2.1.a) Eau de mer naturelle

L'eau de mer naturelle a été prélevée en mer Méditerranée à Narbonne dans des bidons de 10 L. Les contenants ont ensuite été stockés en chambre froide à 4°C. Le [Tableau II-5](#) représente les valeurs concernant les composés d'origine minérale dissous dans l'eau de mer naturelle selon leur abondance.

[Tableau II-5](#) : Composition chimique minérale de l'eau de mer naturelle.

Composé dissous	Concentration (mol.kg ⁻¹)
Chlorure	$5,5.10^{-1}$
Sodium	$4,7.10^{-1}$
Sulfate	$2,8.10^{-2}$
Magnésium	$5,3.10^{-2}$
Calcium	$1,0.10^{-2}$
Potassium	$1,0.10^{-2}$
Bicarbonate	$2,3.10^{-3}$
Bromure	$7,7.10^{-4}$
Acide Borique	$4,2.10^{-4}$
Strontium	$9,1.10^{-5}$
Fluorure	$6,8.10^{-5}$
Lithium	$2,7.10^{-5}$
Rubidium	$1,4.10^{-6}$
Iode	$2,4.10^{-7}$
Zinc	$1,5.10^{-7}$
Cuivre	$1,6.10^{-8}$
Mercure	$4,9.10^{-11}$

II.2.1.b) Eau de mer synthétique

La composition de l'eau de mer synthétique a été donnée pour 1 L dans le [Tableau II-6](#). Le pH a été ajusté à 8.0 avec de la soude (0,1 M). Ce milieu a été stérilisé par autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

Tableau II-6 : Composition chimique de l'eau de mer artificielle (norme ASTM D1141-90)

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
NaCl	24,53
MgCl ₂	5,2
Na ₂ SO ₄	4,09
CaCl ₂	1,16
KCl	0,695
NaHCO ₃	0,201
KBr	0,101
H ₃ BO ₃	0,027
SrCl ₂	0,025
NaF	0,003

Une solution de micronutriments peut être ajoutée. Sa composition est présentée dans le [Tableau II-7](#). Cette solution a été ajoutée (1 %) au milieu eau de mer synthétique avant autoclavage.

Tableau II-7 : Composition chimique de la solution de micronutriments

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
FeCl ₂ , 4 H ₂ O	2,00
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	1,00
MnCl ₂ , 6 H ₂ O	0,60
ZnCl ₂	0,04
H ₃ BO ₃	0,04
CuCl ₂ , 2 H ₂ O	0,04
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,08
NiCl ₂ , 2H ₂ O	1,00
Na ₂ SeO ₃	1,60
HCl 37%	0,2%

Une solution de vitamines peut également être ajoutée. Sa composition, inspirée de « ATCC Vitamin Supplement », est présentée dans le [Tableau II-8](#). Cette solution a été ajoutée stérilement (1 %) au milieu eau de mer synthétique autoclavé par l'intermédiaire d'un filtre (seuil de coupure de 0,2 µm).

Tableau II-8 : Composition chimique de la solution de vitamines

Composé	Concentration (mg.L ⁻¹)
Acide folique	2,0
Chlorhydrate de pyridoxine	10,0
Riboflavine	5,0
Biotine	2,0
Thiamine	5,0
Acide nicotinique	5,0
Pantothenate de calcium	5,0
Cobalamine	0,1
Acide aminobenzoïque	5,0
Acide thioctique	5,0
KH ₂ PO ₄	900,0

II.2.1.c) Milieu Marine Broth et Marine Agar

Le milieu Marine Broth (MB) et le milieu Marine Agar (MA) sont des milieux de culture commerciaux « prêt à l'emploi » (poudre déshydratée) et ont été préparés comme indiqué dans le Tableau II-9, puis stérilisés par autoclavage : 15 minutes à 121°C. Ces milieux présentent un pH d'environ 7,6 à 25°C. Après stérilisation, le milieu MA a été coulé dans des boîtes de Pétri stériles (20 mL par boîtes) puis laissé solidifié sous hotte à flux laminaire. Les milieux gélosés ont été stockés à 4°C.

Tableau II-9 : Composition des milieux Marine Broth (MB) et Marine Agar (MA)

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
Peptone	5,0
Extrait de levure	1,0
Citrate ferrique	0,1
Chlorure de sodium	19,45
Chlorure de potassium	5,9
Sulfate de magnésium	3,24
Chlorure de calcium	1,8
Chlorure de potassium	0,55
Bicarbonate de sodium	0,16
Bromure de potassium	0,08
Chlorure de strontium	34.10 ⁻³
Acide borique	22.10 ⁻³
Silicate de sodium	4.10 ⁻³
Fluorure de sodium	2,4.10 ⁻³
Nitrate d'ammonium	1,6.10 ⁻³
Phosphate disodique	8,0.10 ⁻³
Agar (pour MA)	15,0

II.2.2) *Algoriphagus yeomjeoni*

Cette souche a été isolée au LGC en 2010 à partir d'un biofilm marin formé en eau de mer naturelle sur une électrode en acier inoxydable polarisée à $-0,2$ V/ECS. L'identification a été réalisée en collaboration avec le LEMiRE (Erable, données non publiées).

II.2.2.a) Cinétique de croissance et de production de caroténoïdes

Une préculture a d'abord été réalisée dans un Erlenmeyer de 100 mL. Pour cela, 2 mL d'une suspension stock d'*Algoriphagus yeomjeoni* conservée à -20°C ont été inoculés en milieu Marine Broth afin d'obtenir un volume final de 20 mL, soit un ratio 1/5 dans l'Erlenmeyer. La préculture a été placée à 30°C sous une agitation de 150 rpm pendant une nuit.

Le suivi de la cinétique de croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* ainsi que le suivi de la cinétique de la production des caroténoïdes ont été réalisés en parallèle. La culture a été réalisée dans un Erlenmeyer de 250 mL. Un volume de 45 mL de milieu Marine Broth a été inoculé avec 5 mL du milieu de préculture. La culture a été placée à la température que l'on souhaite étudier sous une agitation de 150 rpm.

Au cours de l'expérience et à différents temps (environ toutes les 2 heures), 2 mL de culture ont été prélevés et lus par spectrophotométrie à 620 nm contre un blanc de milieu Marine Broth pour le suivi de la croissance bactérienne. Puis, ce même échantillon a été centrifugé 5 minutes à 4700 rpm. Le culot a été repris dans 2 mL d'eau distillée puis de nouveau centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot a alors été repris avec 2 mL d'acétone puis une lecture de densité optique a été réalisée à 480 nm pour évaluer la concentration en caroténoïdes.

II.2.2.b) Transformation d'*Algoriphagus yeomjeoni*

Préculture

Une préculture a été réalisée comme décrit précédemment.

Préparation des cellules compétentes

Dans un Erlenmeyer de 250 mL, 45 mL de milieu Marine Broth ont été inoculés avec 5 mL de la préculture. La culture a été incubée à 30°C et agitée à 150 rpm jusqu'à atteindre une $\text{DO}_{620\text{nm}}$ d'environ 0,7 ce qui correspond à une suspension bactérienne d'environ 1.10^9 cellules.mL⁻¹. La culture a été centrifugée à 3000g pendant 6 minutes à 4°C dans une solution de glycérol 10 %. Cette opération a été répétée deux fois. Après la dernière centrifugation, le culot a été repris dans 500 μL de milieu GYT (Glycérol 10 % v/v ; Extrait de levure 0,125 % w/v ; Tryptone 0,25 % w/v), la densité cellulaire atteignait alors environ 1.10^{11} cellules.mL⁻¹. Les cellules ainsi préparées ont été aliquotées par fractions de 100 μL et conservées à -80°C .

Electroporation et sélection des transformants

Une solution contenant 30 ng. μL^{-1} de plasmide purifié pAS43 contenant un gène codant pour la Gfp nous a été gracieusement fourni par le Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'université de Rhode Island (USA). C'est un plasmide contenant un promoteur fort (*PompA-gfp*) devant le gène codant pour la Gfp (green fluorescent protein)

ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline (pour la pression de sélection des transformants). 2,5 μ L de plasmides ont été mis en contact avec 100 μ L de cellules compétentes dans une cuve d'électroporation (Bio-Rad) de 2 mm. On atteignait alors une concentration d'environ 75 ng de plasmide pour 100 μ L de cellules.

Les cellules ont été soumises à une impulsion électrique sous l'action de l'électroporateur (Gene Pulser, Bio-Rad) paramétré à : 25 μ F, 2,5 kV et 600 Ω . Après l'électroporation, les cellules ont été diluées dans 900 μ L de milieu Marine Broth. Elles ont ensuite été incubées à 30°C, sous une agitation de 150 rpm pendant 1 h 30. A partir de cette culture, 100 μ L ont été étalés sur un milieu de culture solide Marine Agar (souche parentale) et 500 μ L sur un milieu de culture solide Marine Agar supplémenté de 100 μ g d'ampicilline (sélection des transformants). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 30°C pendant 3-4 jours. Les transformants qui sont apparus sur le milieu Marine Agar supplémenté en ampicilline ont été stockés à - 80°C dans du glycérol 20 %.

L'ensemble des étapes est résumé dans la Figure II-37, ci-après :

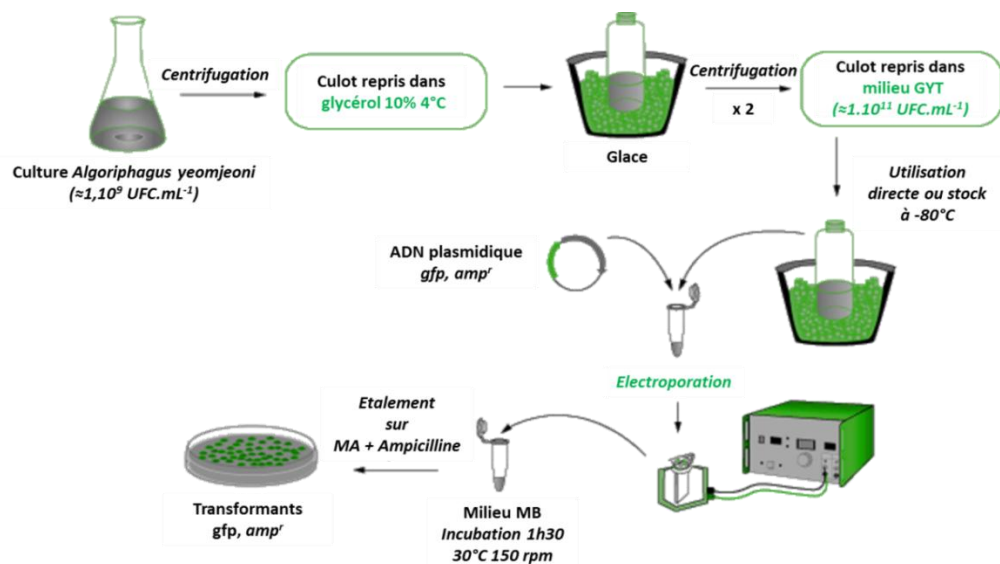


Figure II-37 : Schématisation du protocole de transformation d'*Algoriphagus yeomjeoni*.

II.2.2.c) Tests de colonisation d'*Algoriphagus yeomjeoni*

Coupons : matériaux et traitements

Les différents matériaux utilisés pour étudier l'adhésion d'*Algoriphagus yeomjeoni* sont :

- De l'acier inoxydable 254 SMO (2 cm²)
- De l'acier inoxydable 254 SMO microstructuré, c'est-à-dire ayant subi un traitement mécanique dit de grenaillage (2 cm²). La rugosité moyenne ainsi obtenue était de l'ordre de 1 μ m.

Un conditionnement de ces matériaux a été réalisé dans le but de les débarrasser de leurs impuretés comme décrit dans le paragraphe II.1.1) Electrodes.

Certaines des électrodes support, en plus du nettoyage, ont subi un traitement chimique. En effet, afin de déposer des charges électropositives en surface du matériau, certaines des électrodes ont été recouvertes de 300 μ L d'une solution de poly-L-lysine (100 mg.L⁻¹) pendant 5 minutes puis ont été rincées à l'eau distillée. Un autre traitement de surface consiste en un coating de glucose. Pour une électrode de 2 cm², 200 μ L d'une solution de glucose à 10

g.L⁻¹ a été déposée puis laissée séchée pendant 1 heure sous hotte aspirante. Les coupons ont été utilisés immédiatement après la réalisation des traitements chimiques.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est composé d'un réservoir (flacon Schott) d'un litre, d'une pompe péristaltique et d'une chambre de contact accueillant les électrodes support en acier inoxydable 254SMO ayant subi ou non différents conditionnements (Figure II-38).



Figure II-38 : Dispositif expérimental servant à étudier la colonisation d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur des coupons en acier inoxydable.

Une préculture d'*Algoriphagus yeomjeoni* a été réalisée dans du milieu Marine Broth dilué au 1/3. Les précultures ont été incubées à 30°C et sous agitation à raison de 150 rpm. Après 20 heures d'incubation, moment où les bactéries étaient en phase exponentielle de croissance, la préculture de 20 mL a été inoculée dans 1 Litre de milieu Marine Broth dilué au 1/3 ou en eau de mer synthétique. La suspension ainsi obtenue est répartie dans le réservoir et la chambre de contact. La pompe a été mise en service afin d'amorcer le système et obtenir un déversement de la chambre de contact vers le réservoir. Un flux hydrodynamique est réalisé à l'aide de la pompe péristaltique Minipuls 2 (Gilson) à 25 rpm. Les cinétiques de colonisation ont été menées en milieu Marine Broth dilué au tiers. A $t = 0$, ce qui correspond au démarrage de l'expérience, les coupons ont été immergés dans la chambre de contact expérimental contenant le milieu Marine Broth dilué au tiers et inoculé avec *Algoriphagus yeomjeoni* dont la densité cellulaire est d'environ $8,8.10^7$ cellules.mL⁻¹ ($DO_{620nm} \approx 0,062$). L'expérimentation a lieu sur 24 heures avec des prélèvements effectués à 2, 6, 16 et 24 heures.

Lorsque les expérimentations ont été réalisées en eau de mer synthétique la préculture est passée par une étape de centrifugation à 4500 rpm pendant 10 minutes (deux lavages en eau de mer synthétique) avant inoculation dans le bassin du dispositif expérimental. L'eau de mer synthétique ne permettant pas la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* et voulant opérer dans des conditions se rapprochant de l'expérience en milieu nutritif, la densité cellulaire à $t = 0$

était d'environ 3.10^8 cellules.mL⁻¹ (DO 620 \approx 0.212) ce qui correspond à la densité cellulaire observée au bout de 24 heures lors des expériences menées en milieu nutritif (Marine Broth dilué au tiers).

Afin de pouvoir valider les résultats des expériences de colonisation, des coupons d'aciers inoxydables avec ou sans traitement mécanique/chimique ont été manipulés selon le même mode opératoire mais sans inoculation bactérienne. Ces coupons serviront de témoins lors des observations microscopiques pour vérifier la possible autofluorescence des supports et/ou des traitements.

Préparation des échantillons

Les coupons en acier inoxydable ont été mis en contact avec une solution d'acridine orange (0,01 %, Sigma) pendant 10 minutes, puis ont été rincés avec de l'eau distillée. Avant leurs observations microscopiques, les échantillons ont été déshydratés 24 heures à température ambiante et à l'obscurité.

Observation microscopique

La répartition globale du matériel biologique a été examinée sur les coupons par microscopie en épifluorescence. Les biofilms ont été visualisés avec un microscope Zeiss Axio Imager-M2 équipé avec une source de lumière (HXP 200 C), un filtre Acridine Orange Zeiss (excitation 490 nm, émission 530-640 nm).

Dénombrement

Les images ont été acquises avec une caméra Zeiss AxioCam MRm et ont été traitées avec le logiciel Axiovision. Sur chaque échantillon, trois champs ont été observés. L'acquisition et le traitement d'images, à l'aide du module AutoMesure du logiciel Axiovision, ont permis d'obtenir le taux de recouvrement des coupons. Celui-ci représente l'espace occupé par les cellules bactériennes sur le support.

II.2.2.e) Tests électrochimiques d'*Algoriphagus yeomjeoni*

Les précultures ont été réalisées en Erlenmeyer de 250 mL. Pour cela, 5 mL d'une suspension stock d'*Algoriphagus yeomjeoni* conservée à - 20°C ont été inoculés dans 45 mL de milieu Marine Broth dilué au 1/3 ou au 1/10 ou en eau de mer synthétique supplémentée en glucose (1 g.L⁻¹). Les précultures ont été placées dans un incubateur à 30°C sous une agitation de 150 rpm pendant une nuit.

Afin d'éliminer toutes traces de donneurs d'électrons provenant des milieux utilisés pour les précultures, les cellules bactériennes ont subi un lavage. Les cultures ont été centrifugées à 3000g pendant 6 minutes à température ambiante puis le culot a été repris dans 5 mL d'eau de mer synthétique. Ce lavage a été réalisé deux fois avant inoculation des réacteurs : 5 mL de suspension bactérienne dense dans 500 mL de milieu réactionnel. La densité cellulaire dans les réacteurs électrochimiques était ainsi d'environ 1 à 3.10^8 cellules.mL⁻¹. Dans le cas où l'inoculum était des colonies, celles-ci ont été prélevées sur gélose Marine Agar puis

directement étalées sur l'électrode d'acier inoxydable nettoyée avant immersion dans le réacteur.

Le montage des réacteurs bioélectrochimiques a été réalisé comme présenté dans le paragraphe II.1) Système électrochimique. Les électrodes étaient au nombre de trois : l'électrode de référence au calomel saturée, la contre électrode de platine et l'électrode de travail en acier inoxydable 254SMO de 25 cm² (2.5*10 cm) de surface. Les réacteurs ont été placés dans un bain thermostaté à 30°C. L'aération du milieu a été assurée pour la première expérience par un système d'aération puis pour toutes les expériences suivantes un agitateur magnétique immergeable avec une agitation de 300 rpm a assuré cette fonction (Figure II-39). Un réacteur témoin sans inoculation a été réalisé en parallèle de chaque essai.



Figure II-39 : Vue d'ensemble du dispositif expérimental : 5 réacteurs bioélectrochimiques (système à 3 électrodes en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines à 30°C et sous une agitation à 300 rpm grâce à une plaque agitante immergeable) connectés à un potentiostat multivoies.

La formation des biofilms d'*Algoriphagus yeomjeoni* a été suivie par chronoampérométrie à un potentiel fixe de - 0,2V/ECS. Des voltammétries cycliques ont été régulièrement réalisées entre - 0,7 à + 0,3V/ECS et à une vitesse de balayage de 1 mV.s⁻¹. Cette dernière a été effectuée toutes les 6 heures durant toute la durée des expériences.

II.2.3) Bactéries marines

II.2.3.a) Formation du biofilm marin

La formation des biofilms cathodiques sur acier inoxydable a été réalisée à la station marine ISMAR, Gênes, Italie (Faimali et al., 2010). Le système utilisé pour la polarisation simultanée de plusieurs échantillons d'acier inoxydable à un potentiel cathodique fixe est représenté sur la Figure II-40. Une électrode Ag-AgCl remplie de KCl 3 M (INGOLD 103633040) a été utilisée en tant que référence. Le potentiostat utilisé pour les polarisations est l'Amel 551. Le courant des n échantillons polarisés a été calculé à partir de la chute ohmique ΔV_n mesurée à travers la résistance R_n , dont la valeur a été choisie de manière à mesurer un ΔV_n moins de 10 mV au cours de l'expérience entière. Le potentiel cathodique a été fixé à - 200 mV/Ag-

AgCl (Faimali et al., 2008). Au cours des essais potentiostatiques, l'évolution du courant cathodique a été utilisée comme indice de l'activité électrochimique du biofilm.

Six échantillons ont été immergés pendant 20 jours dans un réservoir d'environ 100 L, dans lequel l'eau de mer était constamment renouvelée ($1,5\text{-}2\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) avec de l'eau naturelle pompée directement en mer.

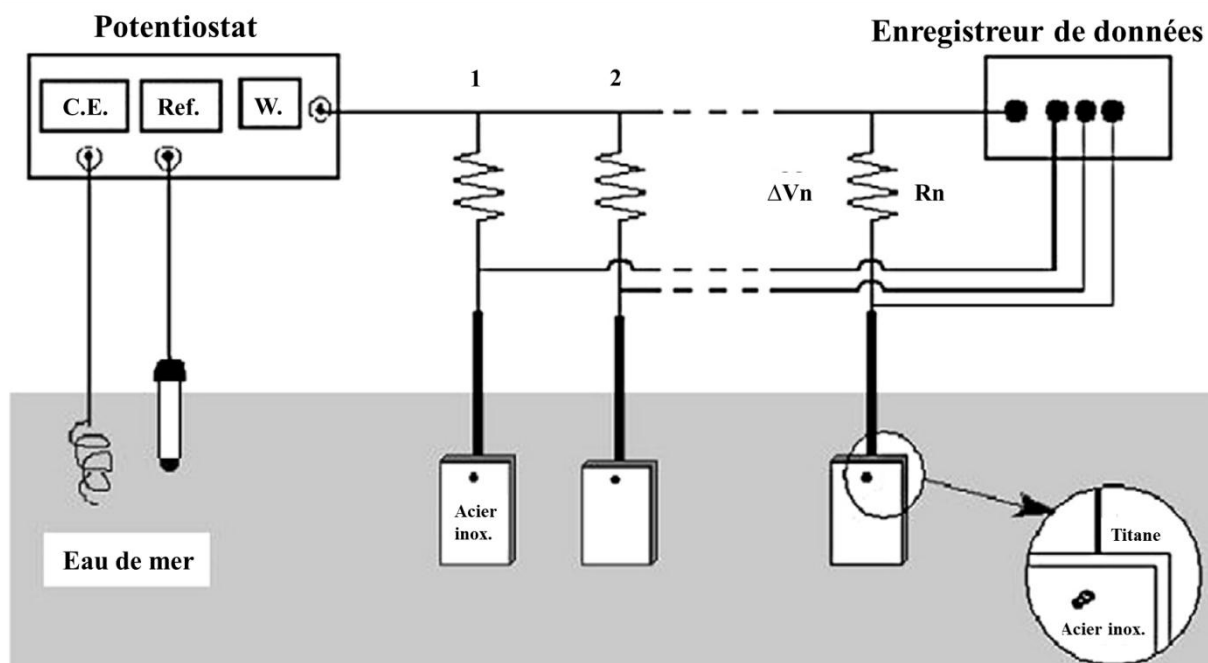


Figure II-40 : Montage utilisé pour la polarisation simultanée de plusieurs échantillons d'acier inoxydable.

Pour la formation des biofilms, les échantillons d'acier inoxydable utilisés ont une dimension de 25 mm x 10 mm pour 1 mm d'épaisseur et ont été découpés dans une plaque d'acier inoxydable 254SMO, forés ($\varnothing = 1,6\text{ mm}$), puis traités avec des papiers abrasifs jusqu'au grain P1200. Avant leurs immersions les échantillons ont été nettoyés avec une solution de HCl 0,1 N. Les connexions électriques entre les échantillons d'acier inoxydable immergés dans la solution et les fils à l'extérieur ont été réalisées par des tiges de titane ($\varnothing = 2\text{ mm}$) convenablement vissées. La surface des tiges de titane exposée à l'eau de mer est une fraction négligeable comparée à la surface d'acier inoxydable connectée ($STi / SSSb5\%$).

Les cathodes, et les biofilms formés à la surface de celles-ci ont été envoyés au LGC par voie postale dans des tubes stériles (Falcon®) dans lesquels ont été ajoutés des cotons humides afin d'éviter la déshydratation des biofilms cathodiques.

II.2.3.b) Diversité microbienne

Extraction génomique

L'extraction génomique a été réalisée sur les colonies qui étaient apparues lors de l'isolement bactérien effectué et décrit en I.2.3.c), ainsi que sur l'échantillon du biofilm marin obtenu par grattage. L'extraction plasmidique a été effectuée selon le protocole du Kit utilisé, le kit UltraClean Soil DNA (Annexe 4).

La concentration en ADN pour chaque extrait a été évaluée en mesurant la DO_{260nm} . La quantité d'ADN étant faible, il a été nécessaire d'amplifier le matériel génétique par PCR.

Amplification (PCR universelle)

Les amorces utilisées sont des amorces d'amplification pour l'ADNr 16S (Invitrogen™):

p8fpl : 3' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 5'

p806R : 3' GGACTACCAGGGTATCTAAT 5'

La préparation du « mix » réactionnel est décrite dans le [Tableau II-10](#).

Tableau II-10 : Préparation du « mix » réactionnel de la PCR.

Composant	Volume final
Go Taq ® Reaction Buffer	10 µL
PCR Nucleotid Mix	1 µL
Upstream primer	5 µL
Downstream primer	5 µL
Go Taq ® DNA Polymerase	0,25 µL
DNA	10 µL
Nuclease-free water	18,75 µL
	50 µL

Le thermocycleur a été paramétré pour réaliser 30 cycles avec une dénaturation initiale : 4 minutes à 95°C, une phase de dénaturation : 1 minute à 94°C, une phase d'hybridation : 2 minutes à 55°C, une phase d'élongation : 2 minutes à 72°C et enfin une phase d'élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Pyroséquençage

Les analyses par pyroséquençage ont été sous-traitées par un laboratoire américain spécialisé : Research and Testing Laboratory. Une fois le séquençage terminé commence le traitement des données communiquées par le laboratoire américain et qui comprend deux phases principales : la vérification de la qualité et « débruitage » et l'analyse de la diversité à proprement parlé.

La vérification de la qualité et nettoyage des séquences (denoising)

Le processus de nettoyage (denoising) est utilisé pour corriger les erreurs de lectures à partir de technologies de séquençage nouvelle génération, y compris la technologie 454. Selon deux publications ([Huse et al., 2007](#); [Quince et al., 2011](#)), le taux d'erreur par base du pyroséquençage 454 atteint un taux de précision de 99,5%. Cependant, au vu du grand nombre de séquences générées cela signifie que le nombre total de séquences pouvant être considéré comme du « bruit » peut être considérable. Afin de déterminer la véritable diversité, il devient essentiel de déterminer quelles séquences contiennent le « bruit » introduit par la plate-forme de séquençage. Il faut donc procéder au « nettoyage » des régions entières de données avant de procéder à la suite des analyses. Ce processus se décompose en quatre grandes étapes principales:

- L'étape « Quality Trimming »

Elle essaie de nettoyer les potentielles extrémités de séquences de mauvaise qualité. Pour cela sont utilisés les scores de qualité fournis par le séquenceur pour déterminer où les données de séquence sont devenues trop bruyantes.

- L'étape « Clustering »

Elle essaie de classer les séquences en clusters et d'ôter les séquences n'arrivant pas à joindre ceux-ci afin d'éliminer les redondances survenues lors du séquençage.

- L'étape « Chimera Checking »

Comme indiqué dans la publication (Edgar et al., 2011) la formation de séquences chimériques se produit quand une extension de séquence abandonnée est mal identifiée et utilisée comme une amorce et se prolonge de façon incorrecte lors de cycles de PCR ultérieurs. Une détection des chimères est effectuée selon la méthode de novo intégré UCHIME. Une fois UCHIME a terminé son exécution, toutes les séquences éventuellement chimériques sont éliminées.

- L'étape « Denoising »

C'est la dernière étape qui prend les données générées par toutes les étapes précédentes et tente de corriger les erreurs de paires de bases et d'enlever les mauvaises séquences, telles que les séquences chimériques et lues comme « bruyantes ».

Après ce nettoyage, les séquences sont condensées en un seul fichier au format FASTA. Le format FASTA est un format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences biologiques de nature nucléique ou protéique. Ces séquences sont représentées par une suite de lettres codant pour des acides nucléiques ou des acides aminés.

L'analyse de la diversité

Afin de déterminer l'identité de chaque séquence, celles-ci seront d'abord triées telles que contenu dans le fichier au format FASTA : du plus long au plus court. Ces séquences sont ensuite regroupées en clusters OTU (Operational Taxonomic Unit) avec 100% d'identité (0% de divergence) en utilisant l'algorithme USEARCH (Edgar, 2010). Pour chaque cluster est créé un fichier de séquence FASTA formaté. Ce fichier est ensuite interrogé contre une base de données de séquences de haute qualité issue du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) en utilisant BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotidic) (KrakenBLAST www.krakenblast.com).

Basé sur le pourcentage d'identité de séquence dérivée du BLASTn ci-dessus, les séquences ont été classées aux niveaux taxonomiques appropriés sur la base des critères suivants :

Séquences avec des scores d'identité	Niveaux taxonomiques
de plus de 97 % d'identité (< 3 % de divergence)	espèce
entre 95 % et 97 %	genre
entre 90 % et 95 %	famille
entre 85 % et 90 %	ordre
entre 80 % et 85 %	classe
entre 77 % à 80 %	phylum
En dessous de 77 %	non prise en compte

Le pourcentage de chaque niveau sera analysé individuellement pour chaque échantillon, fournissant ainsi des informations d'abondance relative au sein de l'échantillon.

II.2.3.c) Isolement des bactéries hétérotrophes

L'électrode en acier inoxydable recouverte de biofilm marin a été grattée dans 2 mL d'eau de mer synthétique à l'aide d'une oese. Cet extrait a été utilisé pour inoculer, à l'aide d'une oese, des géloses de MA ainsi que des géloses d'eau de mer synthétique auxquelles on a ajouté 1 g.L⁻¹ d'une source de carbone (glucose, fructose, glutamate, lactate, pyruvate, acétate, citrate et malate).

Les souches bactériennes isolées ont été conservées de deux façons : au réfrigérateur (4°C) sur gélose Marine Agar et au congélateur (- 20°C) dans des Cryo tubes. L'isolement et les repiquages sur milieux solides ont été faits à partir d'une colonie suspendue dans 1 mL d'eau de mer synthétique. Pour la conservation en Cryo tubes, il a fallu passer par une culture liquide. Une culture liquide a été réalisée dans un Erlenmeyer de 100 mL. Pour cela, une oese de colonie de la souche préalablement isolée a été inoculée dans 18 mL de milieu Marine Broth diluée au 1/3. La préculture a été placée à 30°C sous une agitation de 150 rpm. La culture a été stoppée lorsque la densité optique (DO_{620nm}) a atteint environ 0,5. Les Cryo tubes de 5 mL ont été remplis avec 2 mL de culture bactérienne et 2 mL d'une solution de glycérol à 40 % (concentration finale de 20 %).

II.2.3.d) Identification des isolats bactériens

L'extraction génomique ainsi que l'amplification du matériel génétique ont été réalisées comme présenté dans le paragraphe traitant de la diversité microbienne II.2.3.b). Le séquençage des ARNr 16S a été réalisé par la technique de Sanger et a été pris en charge par Mathieu Berge. Les séquences ont été analysées par BLASTn sur le site NCBI.

II.2.3.e) Tests électrochimiques avec les isolats bactériens

Les précultures ont été réalisées en Erlenmeyer de 250 mL contenant 45 mL de milieu Marine Broth dilué au 1/3. Ces 45 mL de milieu ont été inoculés par 5 mL d'une suspension stock d'une souche bactérienne, conservés à - 20°C. Le volume total était donc de 50 mL. Les précultures ont ensuite été placées dans un incubateur à 30°C sous une agitation de 150 rpm pendant 24 heures. Les 50 mL de cette préculture ont été transvasés stérilement dans un tube type Falcon®. L'électrode en acier inoxydable, nettoyée comme décrit dans la partie II.1.1.c), a alors été immergée intégralement dans la suspension bactérienne pendant 1 heure sans agitation. L'électrode de travail correspond à une plaque d'acier inoxydable 254SMO de 16 cm² (2*8 cm) de surface. Les réacteurs ont été placés dans un bain thermostaté à 30°C. Les 50 mL de précultures ont été ajoutés dans les 450 mL d'eau de mer naturelle filtrée ou synthétique se trouvant dans le réacteur électrochimique. L'agitation à 300 rpm du milieu a été assurée par une plaque agitante immergeable. Un réacteur témoin non inoculé a été systématiquement réalisé en parallèle de chaque essai pour valider que la catalyse des réactions électrochimiques soit bien d'origine bactérienne.

II.3) Etude de *Lactococcus lactis*

Deux souches de *Lactococcus lactis* provenant de l'institut MICALIS ont été étudiées. *Lactococcus lactis* IL1403, ou VE17132, ne synthétisant pas de pili (« pil – ») et *Lactococcus lactis* IL1403 pPil, ou VE17173, possédant des pili à sa surface (« pil + ») (Oxaran et al., 2012).

II.3.1) Milieux de culture de *Lactococcus lactis*

Quel que soit le milieu utilisé, celui-ci a toujours été supplémenté de glucose afin d'obtenir une concentration massique finale de 0,5 %.

II.3.1.a) Milieu « Resting Cell »

Le milieu « Resting Cells » (RC) a été réalisé selon la composition présentée dans le [Tableau II-11](#) (Freguia et al., 2009). Puis a été stérilisé par autoclavage : 121°C pendant 15 minutes.

Tableau II-11 : Composition du milieu « Resting Cells ».

Composé	Concentration
Tampon phosphate	100 mM pH7
KCl	80 mM
NH ₄ Cl	4 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 mM
FeCl ₃ , 6H ₂ O	0,56 µm
H ₃ BO ₃	0,24 µM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	12 nM
KI	0,11 µM
MnCl ₂ , 4H ₂ O	61 nM
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	24,7 nM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	41,7 nM
CoCl ₂ , 6H ₂ O	63,1 nM
NiCl ₂ , 6H ₂ O	8,4 nM
EDTA	3,4 µM

II.3.1.b) Milieu MCD Lactocoques

Les bactéries lactiques ont des besoins nutritionnels complexes. Par exemple, elles ne sont pas capables de synthétiser certains acides aminés à partir d'une source azotée simple. Les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques ont été déterminées par leur aptitude à croître, ou non, dans un milieu chimiquement défini (MCD). Des MCD ont été développés pour différents genres bactériens dont *Lactococcus*. Généralement, les MCD contiennent des vitamines, des sels minéraux, des bases d'acides nucléiques, des acides aminés et du glucose. Le milieu MCD Lactocoques a été préparé à partir de plusieurs solutions présentées dans le [Tableau II-12](#).

Tableau II-12 : Milieu MCD

Préparation des vitamines (X20)	
Composés	Masse à peser (g)
Acide para aminobenzoïque	0,2
Biotine	0,2
Acide folique	0,02
Acide nicotinique	0,02
Acide pantothénique	0,02
Riboflavine	0,02
Thiamine	0,02
Pyridoxine	0,04
Cyanocobalamine	0,02
Acide orotique	0,1
2-déoxythymidine	0,1
Inosine	0,1
Acide thioctique	0,05
Pyridoxamine	0,1
Eau milli Q	Qsp 1L
Le pH de la solution est ajusté à 7,0 avec une solution de NaOH 5N, aliquotée dans des tubes de 50 mL et congelée à -20°C.	

Préparation des sels minéraux (X100)	
Composés	Masse à peser (g)
MgCl ₂ , 6H ₂ O	2,0
FeCl ₂ , 4H ₂ O	0,05
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,5
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,05
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
Eau milli Q	Qsp 100 mL
La solution est aliquotée dans des tubes de 15 mL et congelée à -20°C.	

Préparation des acides nucléiques (X100)	
Composés	Masse à peser (g)
Adénine	0,1
Guanine	0,1
Uracil	0,1
Xanthine	0,1
Eau milli Q	Qsp 100 mL
La solution est aliquotée dans des tubes de 15 mL et congelée à -20°C.	

Préparation des acides aminés (X3)	
Composés	Masse à peser (g)
L-alanine	0,72
L-arginine	0,36
L-asparagine	1,02
L-glutamine	1,53
L-glycine	0,51
L-histidine	0,33
L-isoleucine	0,6
L-leucine	1,41
L-lysine	1,05
L-méthionine	0,36
L-proline	2,04
L-sérine	1,02
L-thréonine	0,69
L-tryptophane	0,15
L-valine	0,99
L-glutamate	0,6
Eau milli Q	Qsp 600 mL
L-cystéine	0,5
NaOH 0,1N	Qsp 100 mL
L-phénylalanine	0,84
HCl 0,01N	Qsp 84 mL
L-tyrosine	0,87
NaOH 0,1N	Qsp 174 mL
Eau milli Q	Qsp 1L
Le pH de la solution est ajusté à 6,6 avec une solution de NaOH 5N, aliquotée dans des tubes de 50 mL et congelée à -20°C.	

Préparation du tampon glucose (X20)	
Composés	Masse à peser (g)
D-glucose	50
Acétate de sodium	20
Citrate tri-sodique	15,6
KH ₂ PO ₄	180
K ₂ HPO ₄	150
Eau milli Q	Qsp 1L
La solution est aliquotée dans des tubes de 50 mL et congelée à -20°C.	

50 mL de la solution de vitamines (X20), 10 mL de la solution de sels (X100), 10 mL de la solution d'acides nucléiques (X100), 50 mL de la solution tampon glucose (X20), 330 mL de la solution d'acides aminés (X3) et 50 mL d'eau distillée ont été mélangés. Le pH a été vérifié et il a toujours été de 6,6. Cette solution de 500 mL a été filtrée (0,2 μ m) dans un flacon stérile et complété qsp 500 mL d'eau distillée stérile pour obtenir 1 Litre de milieu MCD Lactocoques. Le milieu doit être utilisé dans la semaine suivant sa préparation. En attendant, il a été stocké à 4°C.

II.3.1.c) Milieu M17 Broth

Le milieu M17 a été développé pour la croissance de bactéries lactiques dans le lait et les produits laitiers. Il est bien adapté pour la culture de *Lactococcus lactis*. Sa préparation est présentée dans le [Tableau II-13](#).

Tableau II-13 : Composition empirique du milieu M17.

Composé	Concentration (g.L ⁻¹)
Digestion pancréatique de caséine	5,0
Peptone de soja	5,0
Extrait de bœuf	5,0
Extrait de levure	2,5
Acide ascorbique	0,5
Sulfate de magnésium	0,25
Glycérophosphate de sodium	19,0

Le milieu M17 a été stérilisé par autoclavage, 15 minutes à 121°C. Le pH final est d'environ 6,9. Le glycérophosphate disodique apporte un important pouvoir tampon et a un faible effet sur la production d'acide dans les cultures.

II.3.2) Transformation de *Lactococcus lactis*

Deux souches de *Lactococcus lactis* ont subi une transformation afin d'acquérir un plasmide porteur du gène permettant l'expression de la Gfp. Une des deux souches, VE17173, contient déjà un plasmide pPil ce qui lui donne la particularité de présenter des pili à sa surface et lui apporte aussi une résistance à l'érythromycine. Ainsi, un ajout d'érythromycine a été nécessaire tout au long des protocoles concernant cette souche. L'autre souche est la souche VE17232 Δ Pil qui ne possède pas de pili à sa surface.

II.3.2.a) Préculture

Dans un tube à essai, une oese de la souche conservée à - 80°C a été inoculée dans 5 mL de milieu M17 supplémenté en glucose 0,5 % (Ery 5 μ g/mL pour la souche VE17173). La culture a été incubée à 30°C sans agitation pendant 6 à 8 heures.

II.3.2.b) Préparation des cellules compétentes

Tout d'abord, 10 mL de milieu M17 Glucose 0,5 %-Saccharose 7 % Glycine à 0,5, 1, 1,5 et 2 % ont été inoculés avec 1 mL de préculture. Les quatre suspensions ont été incubées à 30°C sans agitation pendant une nuit. Les DO_{600nm} les plus élevées ont été obtenues avec le milieu contenant 1,5 % de glycine. C'est donc ce pourcentage de glycine qui a été utilisé pour la suite des expérimentations. Ensuite, 200 mL de M17 Glc-Sac-Glycine 1,5 % ont été inoculés avec 5 mL de la culture précédente (celle avec 1,5 % de glycine). Cette culture a été placée pendant 5-6 heures à 30°C sans agitation pour atteindre une DO_{600nm} comprise entre 0,3 et 0,6. Les cellules ont été centrifugées à froid à 6000 rpm pendant 10 minutes puis resuspendues dans 200 mL de Sac (0,5 M)/Glycérol (10 %) (Sac-Gly). Ce lavage a été répété une fois puis le culot a été repris dans 20 mL de Sac-Gly froid. Après une ultime centrifugation, le culot a été repris dans 2 mL de PEG 3000 30 % Glycérol-10 % (PEG-Gly) puis réparti en aliquots de 100 μ L. Ces aliquots ont été stockés à - 80°C.

II.3.2.c) Extraction plasmidique, digestion et migration sur gel

Trois souches de *Lactococcus lactis* contenant chacune un plasmide porteur d'un gène exprimant la Gfp ont été mises en culture :

- Souche VE17228 contenant le plasmide pGhost-8gfp ; une oese dans 10 mL de M17 Glc 0,5 %
- Souche VE17229 contenant le plasmide pIL2608gfp ; une oese dans 10 mL de M17 Glc 0,5 % et Tétracycline
- Souche VE17231 (*Enterococcus faecalis*) contenant le plasmide pMV518gfp ; une oese dans 10 mL M17 Glc 0,5 %.

Les cultures ont été mises à incuber une nuit à 30°C et sans agitation.

L'extraction plasmidique a été effectuée selon le protocole du kit Invitrogen PureLink pour les souches VE17228 et VE17229 ([Annexes 5](#)). En ce qui concerne la souche VE17231, qui est un entérocoque, l'extraction plasmidique a été effectuée selon le protocole MiniPreps Rapides ([Annexes 6](#)). Une digestion par enzyme de restriction suivie d'une migration sur gel d'agarose (2 % en tampon Tris, Acétate, EDTA, TAE 1X) a été effectuée sur les extraits plasmidiques afin de pouvoir les quantifier sommairement selon l'intensité des bandes obtenues sur la photographie du gel électrophorétique. L'électrophorèse a été réalisée à 80V et 60 mA et a duré entre 1 et 2 heures selon les gels. Les bandes d'ADN ont été révélées dans un bain de 15 minutes dans du BET (Bromure d'éthidium) avant d'être placées sous le lecteur.

II.3.2.d) Electroporation, sélection des transformants et vérification de l'insertion plasmidique

Les cellules compétentes ont été décongelées dans de la glace puis légèrement vortexées. Dans chaque tube a été ajouté un volume maximal de 10 μ L d'ADN plasmidique. Le tout a été vortexé puis transféré dans une cuve de 0,2 cm. L'électroporation a été réalisée avec un Gene Pulser paramétré à 25 μ F, 2,5 kV et 200 Ω . Suite au choc électrique, 1 mL de M17 Glc-Sac 0,5 M a été directement ajouté dans la cuve. Les cellules (200 μ L) ont été étalées sur différentes géloses :

- Ery (I) : M17 (250 mL), Glucose (2,5 mL) et Erythromycine (5 μ L.mL⁻¹) pour les souches parentales VE 17173
- Tet (II) : M17 (250 mL), Glucose (2,5 mL) et Tétracycline (5 μ L.mL⁻¹) pour les transformants de VE 17232

- EryTet (III) : M17 (250 mL), Glucose (2,5 mL), Erythromycine ($5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) et Tétracycline ($5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) pour les transformants de VE 17173

Une extraction, une digestion par enzyme de restriction suivie d'une migration sur gel d'agarose ont été effectuées sur les transformants afin de vérifier l'insertion des plasmides contenant le gène exprimant la Gfp.

II.3.3) Tests de colonisation de *Lactococcus lactis*

II.3.3.a) Préparation des échantillons

Le marquage des cellules bactériennes a été effectué avec du Syto 9 (solution de 20 μL de Syto 9 diluée dans 1 mL de milieu M17 glucose 0,5 %). Les suspensions bactériennes ont été retirées des puits des microplaques qui ont été rincés avec 200 μL de milieu M17 stérile. Puis, 50 μL de la solution de marquage préalablement préparée ont été introduits dans chacun des puits. Un temps de contact de 10 minutes a été respecté avant observation

II.3.3.b) Appareillage

Les puits ont été observés au microscope confocal à balayage laser Leica SP2 (trois champs par puits). Tous les biofilms ont été scannés à 400 Hz en utilisant un objectif 106 ou 636 à immersion. Les microorganismes ont été excités à 488 nm avec un faisceau laser à argon, et la fluorescence émise a été recueillie dans la gamme de 500 à 600 nm sur un photomultiplicateur.

II.3.3.c) Observation et analyse de la colonisation

Des coupes des biofilms présents dans les puits ont été réalisées tous les 2 μm en z. Le biovolume et l'épaisseur des biofilms ont été calculés par l'intermédiaire d'un logiciel : Imaris 7.2.0. (Bitplane, Switzerland) et d'un programme MatLab.

II.3.4) Tests électrochimiques de *Lactococcus lactis*

Les souches ont été transférées de l'institut MICALIS (Massy) au Laboratoire de Génie Chimique sur un milieu gélosé adéquat, pour effectuer les tests électrochimiques. Les essais ont été réalisés avec les souches 17173 dite « pil+ » et 17232 dite « pil- ». Une préculture a été réalisée dans un tube à essai de 20 mL. Pour cela, une oese d'une suspension stock de *Lactococcus lactis* conservée à -20°C a été inoculée dans 5 mL de milieu M17 Glucose 0,5 % avec ajout d'érythromycine (concentration finale : $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pour la souche « pil+ ». La préculture a été placée à 30°C pendant 12 heures. Ces 5 mL de préculture ont ensuite servis à inoculer 1 L de milieu M17 Glucose 0,5 % (Erythromycine pour « pil+ ») qui a ensuite été incubé à 30°C pendant une nuit. La suspension bactérienne ainsi obtenue a été centrifugée à 4500 rpm pendant 10 minutes (4 fois 250 mL pour centrifuger 1 L). Le culot a été repris dans 5 mL du milieu qui va être utilisé lors de l'expérience électrochimique prévue supplémenté de glucose 0,5 % et d'érythromycine pour la souche « pil+ ». Le tissu de carbone de 6 cm^2 (3*2 cm) faisant office d'électrode de travail a été plongé dans cette suspension cellulaire dense pendant 3 heures et 30 minutes à 30°C . Le montage électrochimique a été réalisé comme décrit dans le paragraphe II-1) Système électrochimique.

Chapitre III

**Compréhension et optimisation
d'une biocathode « modèle » de
réduction du dioxygène**

**Focus sur les biofilms
d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur des
électrodes en acier inoxydable**

III.1) Contexte et objectifs de travail

III.1.1) Historique et bilan des travaux concernant les biocathodes aérobies au LGC

Depuis la fin des années 1990, la recherche fondamentale menée autour des piles à combustibles microbiennes s'est intensifiée et a fait émerger depuis 2002 le concept de « catalyse électromicrobienne » c'est-à-dire la catalyse de réactions électrochimiques due à la formation d'un biofilm microbien sur la surface des électrodes. Cette même année, une équipe du Laboratoire de Génie Chimique (LGC) démontrait un phénomène de transfert d'électrons entre un biofilm marin aérobic et une cathode d'acier inoxydable. Cette propriété innovante a été valorisée au travers d'un brevet que le CNRS a co-déposé avec le CEA (Bergel et Féron, 2002). Depuis, divers projets réalisés au LGC ont permis de développer cette idée de biocathodes en milieu marin.

Depuis 2005, au cours du projet « Bactériopile » (ANR), le LGC maîtrise la formation de biofilms électroactifs marins capables de catalyser la réduction du dioxygène sur des cathodes en acier inoxydable. En effet, une cathode microbienne en acier inoxydable recouverte d'un biofilm marin associée à une anode en platine abiotique a produit une puissance maximale de 270 mW.m^{-2} . Cette puissance chute à $2,8 \text{ mW.m}^{-2}$ lorsque le biofilm est retiré de la cathode, démontrant ainsi le rôle de catalyseur du biofilm marin (Bergel et al., 2005). Depuis, plusieurs essais ont été réalisés pour mettre en œuvre ces cathodes microbiennes dans des piles à combustibles microbiennes directement exposées à un milieu marin, à Gênes en Italie (expériences *in situ*) (Dumas et al., 2007; Dumas et al., 2008b). En 10 jours de fonctionnement, les densités de courant de la biocathode sur acier inoxydable ont atteint jusqu'à $10,5 \text{ A.m}^{-2}$.

Ces performances ont voulu être reproduites non plus en milieu marin ouvert mais dans des conditions de laboratoire. Les expériences électrochimiques ont donc été renouvelées en réacteurs fermés contenant de l'eau de mer naturelle de Gênes (Erable et al., 2010). A partir de ces biofilms marins ont été isolées deux souches bactériennes électroactives dont une identifiée comme *Algoriphagus yeomjeoni* (phylum Bacteroidetes) (collaboration avec le LEMiRE) (Figure III-41 et 42).

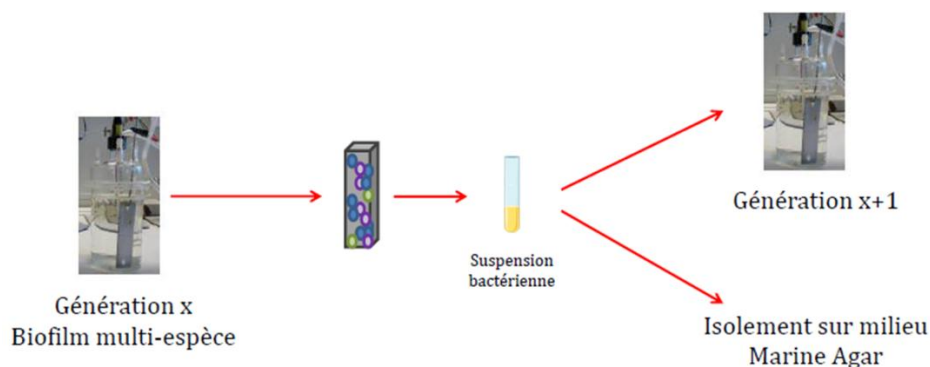


Figure III-41 : Démarche originale d'isolement de bactéries marines (Erable, données non publiées).

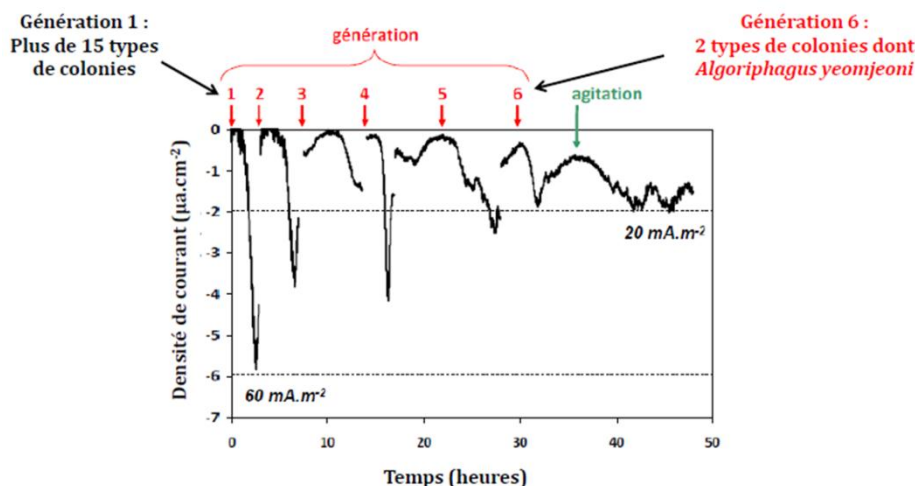


Figure III-42 : Chronoampérogramme d'un biofilm marin formé sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à $-0,2$ V/ECS et isolement et identification de la souche *Algoriphagus yeomjeoni* (Erable, données non publiées).

Cette souche, dans des conditions simulant celles du milieu marin, forme des biofilms électroactifs monoespèces pouvant fournir jusqu'à 1 A.m⁻² (Figure III-43). En passant du milieu naturel au laboratoire, les densités de courant ont été divisées par 10, indiquant qu'un biofilm monoespèce formé au laboratoire est moins performant qu'un biofilm pluriesspèce formé en milieu marin.

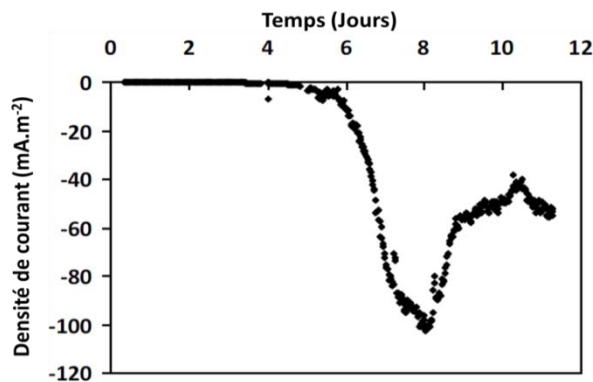


Figure III-43 : Evolution du courant au cours du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO lors de la formation d'un biofilm d'*Algoriphagus yeomjeoni* en eau de mer naturelle et sous un potentiel de -0,2 V/ECS (données non publiées, Benjamin Erable).

L'expérience a été réalisée avec 3 électrodes : une électrode de référence ECS, une contre électrode de platine et une électrode de travail en acier inoxydable 254SMO. Le courant de réduction a été observé au bout de 5 jours. Avec un potentiel de - 0,2 V/ECS, la densité de courant maximale est de - 1 A.m⁻² au bout de 8 jours d'expérimentation. Les performances ont diminué dès que le maximum a été atteint.

III.1.2) Objectifs de travail

Ce travail avec *Algoriphagus yeomjeoni* a pu démontrer qu'il est possible de former une biocathode réduisant le dioxygène avec un biofilm monoespèce. Toutefois, ces expériences se sont déroulées en eau de mer naturelle, dont la composition est variable selon la localisation du prélèvement et le climat lors de la réalisation de celui-ci. Cette variabilité pourrait induire des problèmes de reproductibilité lors des expérimentations électrochimiques. C'est pourquoi il a été décidé de travailler dans un milieu contrôlé, l'eau de mer synthétique.

L'objectif est d'optimiser la biocathode formée par un biofilm d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur acier inoxydable en eau de mer synthétique.

La première section présente la caractérisation de la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* en milieu riche ainsi qu'en eau de mer synthétique. La production de caroténoïdes, qui ont potentiellement un rôle dans le transfert d'électrons avec l'électrode, a également été étudiée.

Dans la seconde section, l'étude de la colonisation de l'acier inoxydable par *Algoriphagus yeomjeoni* a été mise en avant. Cette étude vise à mettre en place plus rapidement la production de courant et à augmenter le nombre de cellules adhérentes ce qui permet d'améliorer les performances électrochimiques.

Enfin, la troisième section expose la mise en place d'un protocole permettant l'obtention d'une biocathode formée avec un biofilm d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur acier inoxydable en milieu contrôlé, l'eau de mer synthétique.

III.2) Croissance d'*Algoriphagus* et production de caroténoïdes

Le genre *Algoriphagus* a été découvert en 2003 dans l'océan Antarctique (Bowman et al., 2003). Les microorganismes à coloration de Gram négative de ce genre présentent une morphologie variable de coccobacilles à filaments courts aux extrémités arrondies. Ce sont des bactéries marines chimiohétérotrophes adaptées au froid et strictement aérobies. Les bactéries du genre *Algoriphagus* produisent des pigments roses et rouges. Selon l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S, *Algoriphagus* est un membre de la classe Flavobacteria et appartenant donc au phylum Bacteroidetes (Nedashkovskaya et al., 2004). *Algoriphagus yeomjeoni* est une espèce qui fut isolée la première fois dans un marais salant dans la mer Jaune en Corée (Yoon et al., 2005). La température et le pH optimum de croissance sont respectivement de 25-30°C et pH 7-8.

Le séquençage du génome d'*Algoriphagus* a été réalisé en 2011 (Alegado et al., 2011). La coloration orange rouge des colonies s'explique par la présence dans le génome d'*Algoriphagus* de nombreux gènes codant pour des enzymes de synthèse de caroténoïdes. Un cluster de gènes de synthèse de caroténoïdes avait déjà été isolé à partir d'une souche d'*Algoriphagus* sp synthétisant un caroténoïde connu sous le nom de fléxixanthine (Tao et al., 2006). Les caroténoïdes sont des pigments absorbant la lumière entre 380 et 750 nm. Ils regroupent les carotènes (caroténoïdes hydrocarbonés) et les xanthophylles (caroténoïdes porteurs de fonctions alcool, cétone, époxy...). La fléxixanthine porteuse de fonctions alcool et cétone fait donc partie des xanthophylles (Figure III-44).

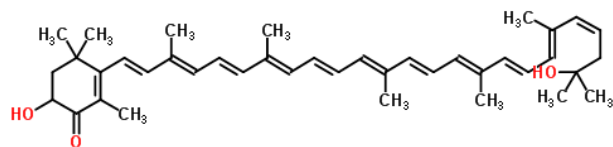


Figure III-44 : Structure de la fléxixanthine.

Plus de 600 caroténoïdes naturels, ayant des structures très variées, ont été décrits à ce jour ; même des caroténoïdes marins (Riccioni et al., 2011). Il existe donc une grande variété de structures parmi les caroténoïdes synthétisés par les bactéries (Stahl & Sies, 2003). De nature lipidique, les caroténoïdes sont solubles dans des solvants organiques plus ou moins polaires. Dans cette étude, les caroténoïdes ont été extraits dans de l'acétone. Mais l'intérêt de ces pigments tient également à leurs propriétés antioxydantes. Cet effet antioxydant présente un avantage pour toutes les espèces aérobies. Il est connu que l'action antioxydante des caroténoïdes peut être déterminée par les réactions de transfert d'électrons et la stabilité de ses radicaux libres (Bast et al., 1998). Ces caroténoïdes pourraient jouer un rôle dans le transfert d'électrons dans les biocathodes à oxygène.

III.2.1) Effet de la température et du milieu sur la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni*

La température est connue pour être un paramètre critique en ce qui concerne les performances des cathodes abiotiques catalysant la réduction du dioxygène (Renslow et al., 2011). L'effet de la température n'a pas été étudié pour les biocathodes mais l'a été pour les bioanodes (Liu.Y et al., 2011). Ainsi, les performances bioélectrocatalytiques d'une bioanode ont augmenté avec l'élévation de la température effectuée de 0 à 45°C (Patil et al., 2010).

Le suivi de la cinétique de croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* a été réalisé à trois températures d'incubation différentes : 25, 30 et 37°C comme décrit dans le Chapitre II.2.2.a).

Lors de la caractérisation faite sur l'espèce *Algoriphagus yeomjeoni*, il a été montré que ce microorganisme a une croissance possible entre 4 et 35°C et que sa température optimale de croissance se situe entre 25-30°C sur milieu Marine Agar (Yoon et al., 2005). Afin de déterminer la température optimale de croissance de notre isolat en milieu Marine Broth et sous une agitation de 150 rpm, trois températures d'incubation ont été testées. Les températures de 25 et 30 °C ont été choisi en relation au travail de caractérisation de cette souche bactérienne. Et, bien qu'aucune croissance n'ait pu être observée au-delà de 35°C, une température de 37°C a également été testée. Ce choix de tester une température plus élevée et liée au fait que des travaux sur des bioanodes ont montré des conséquences positives sur les performances électrochimiques des biofilms électroactifs (Cercado-Quezada et al., 2010).

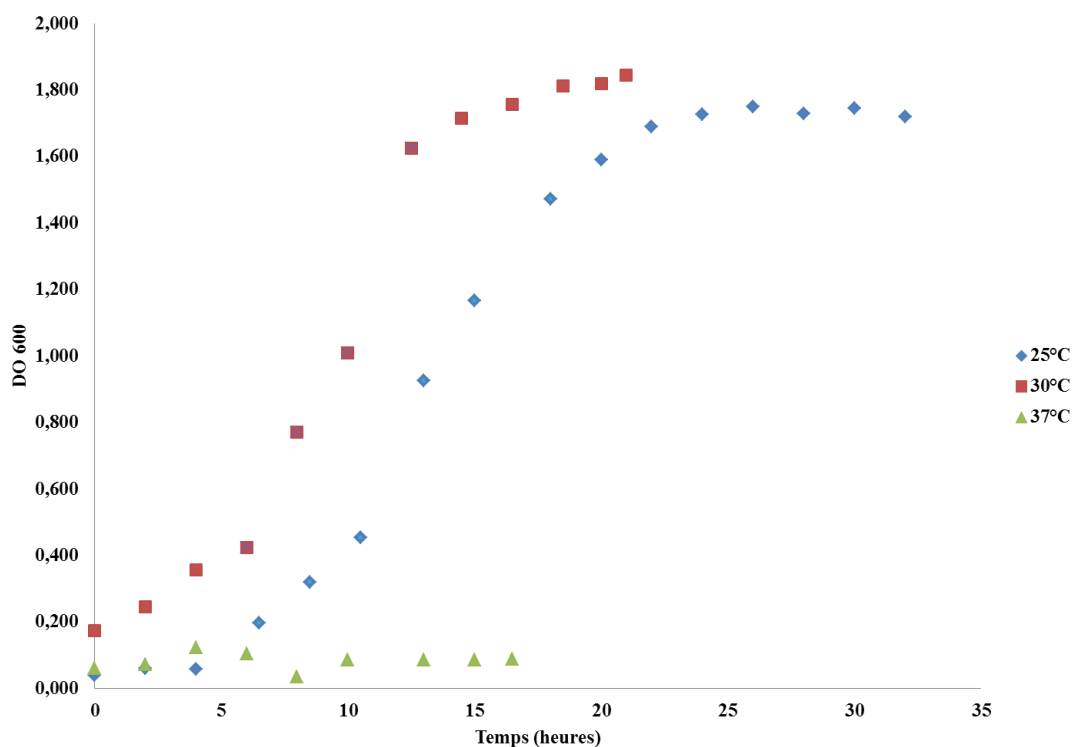


Figure III-45 : Suivi de croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* par mesure de la densité optique en milieu Marine Broth à 25,30 et 37°C et sous une agitation de 150 rpm.

Sur la Figure III-45 ci-dessus, on peut constater qu'une température de 37°C n'a pas permis la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur la période d'incubation de 17 heures. Le métabolisme et les enzymes permettant le fonctionnement général des cellules bactériennes de cet isolat d'*Algoriphagus yeomjeoni* n'a pas supporté cette température.

Par contre, une croissance a été observée à 25 et 30°C. A la fin des cultures à 25 et 30°C, lorsque la densité optique (DO_{600nm}) était d'environ 1,790, la concentration de cellules cultivables a été estimée par dénombrement sur le milieu gélosé Marine Agar. Celle-ci était de $2,5 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹.

Au vu de ces résultats, toutes les expériences suivantes concernant la mise en œuvre d'*Algoriphagus yeomjeoni* ont été menées à une température de 30°C.

Ces données sur la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* ont été réalisées en milieu riche, le milieu Marine Broth. Cependant, les expériences électrochimiques ont été réalisées en eau de mer synthétique. Il est alors nécessaire de savoir quel effet aura ce milieu dit « pauvre » sur la croissance de notre souche microbienne.

Le suivi de croissance a été effectué dans deux conditions :

- En eau de mer synthétique supplémentée en vitamines. Cet apport de vitamines, qui sont des substances organiques, pourrait pallier le manque de matière organique dans l'eau de mer synthétique et qui est présente en eau de mer naturelle. En effet, seule la composition minérale de l'eau de mer naturelle a été présentée dans le paragraphe II.2.1) mais cela ne signifie pas qu'elle ne contient pas de matière organique. La

matière organique dans l'eau de mer, du fait de sa concentration plus faible que celle des éléments minéraux, est plus difficile à analyser.

- En eau de mer synthétique supplémentée en vitamines ainsi que d'une source de carbone organique représentée par du glucose ou de l'acétate à une concentration d'1 g.L⁻¹.

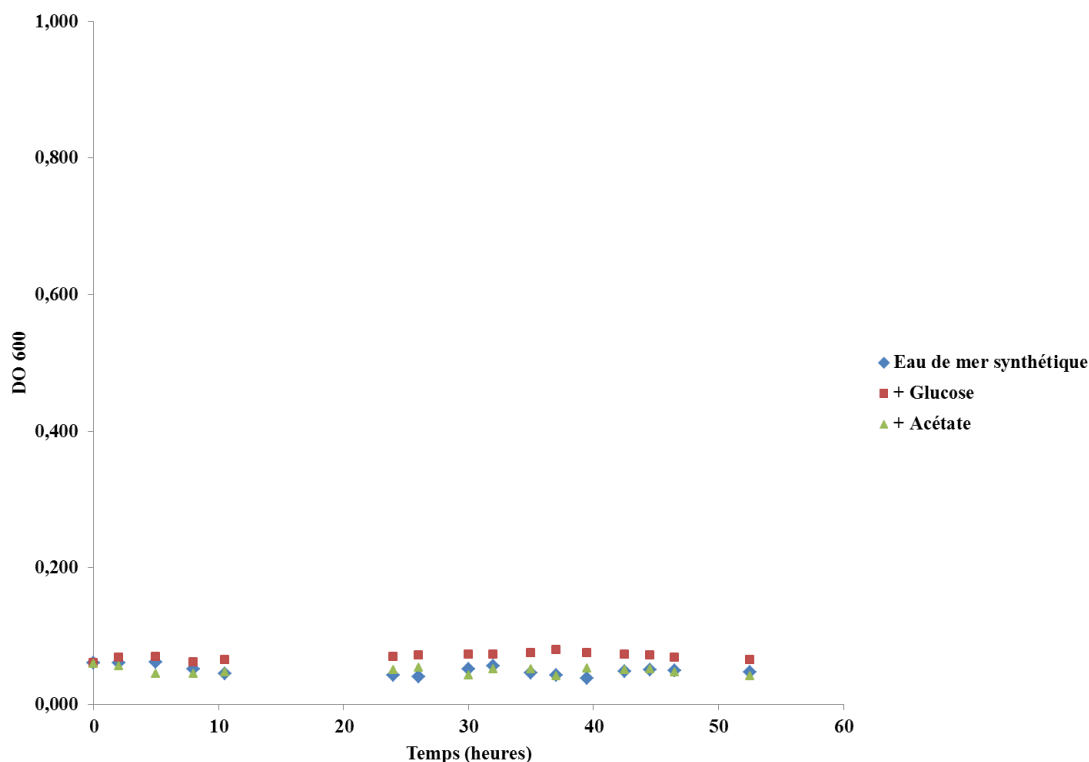


Figure III-46 : Suivi de croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* par mesure de la densité optique en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines (bleu) ainsi qu'en glucose (1 g.L⁻¹) (rouge) ou en acétate (1 g.L⁻¹) (vert) à 30°C et sous une agitation de 150 rpm.

Quel que soit le milieu réactionnel étudié, aucune croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* n'a pu être observée (Figure III-46). En effet, les densités optiques reflétant la concentration cellulaire ont stagné à environ 0,070. La présence d'une source de carbone organique (ici, le glucose et l'acétate) n'a pas permis d'amorcer la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni*.

L'eau de mer synthétique supplémentée en vitamines, milieu utilisé dans les réacteurs électrochimiques et dont la composition est contrôlée, n'a pas permis d'observer la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur une période de 48 heures.

Après avoir étudié l'influence de la température et du milieu de culture sur la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni*, deux autres paramètres, la luminosité et l'oxygénation forcée, ont été testés. Ces paramètres ont été analysés afin de voir leur influence sur la croissance des microorganismes mais surtout sur leur production de caroténoïdes pouvant avoir un rôle dans le transfert électronique avec l'électrode.

III.2.2) Cinétique et optimisation de production de caroténoïdes

La production de caroténoïdes par *Algoriphagus* a pu être suivie par spectrophotométrie après extraction. En effet, ces caroténoïdes ont pu être extraits avec de l'acétone et dosés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 480 nm. Cette longueur d'onde a été choisie après avoir effectué un balayage spectral entre 350 et 700 nm (Figure III-47) sur un extrait acétone/caroténoïdes.

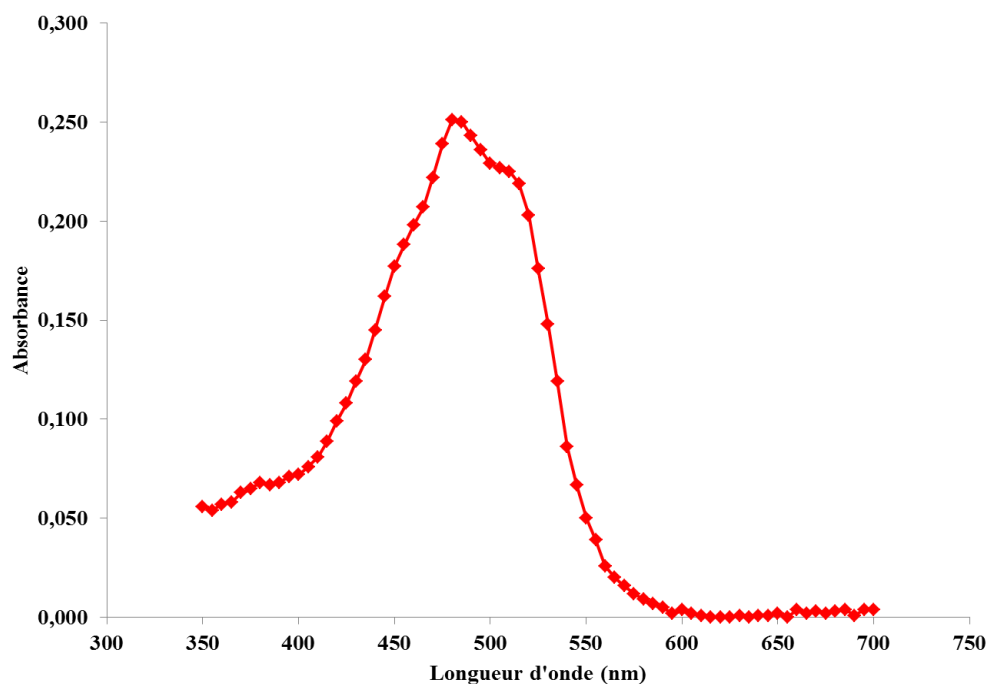


Figure III-47 : Balayage spectral ($300 < \lambda < 700$) d'une solution d'acétone contenant les caroténoïdes produits par *Algoriphagus yeomjeoni*.

L'effet de la lumière et de l'oxygénation forcée du milieu a été étudié sur la cinétique de croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* et la cinétique de production des caroténoïdes en milieu Marine Broth comme décrit en II.2.2.a).

- L'obscurité a été créée en enveloppant l'Erlenmeyer contenant la culture bactérienne avec du papier aluminium.
- L'oxygénation forcée a été réalisée par barbotage à partir d'une bouteille de dioxygène.

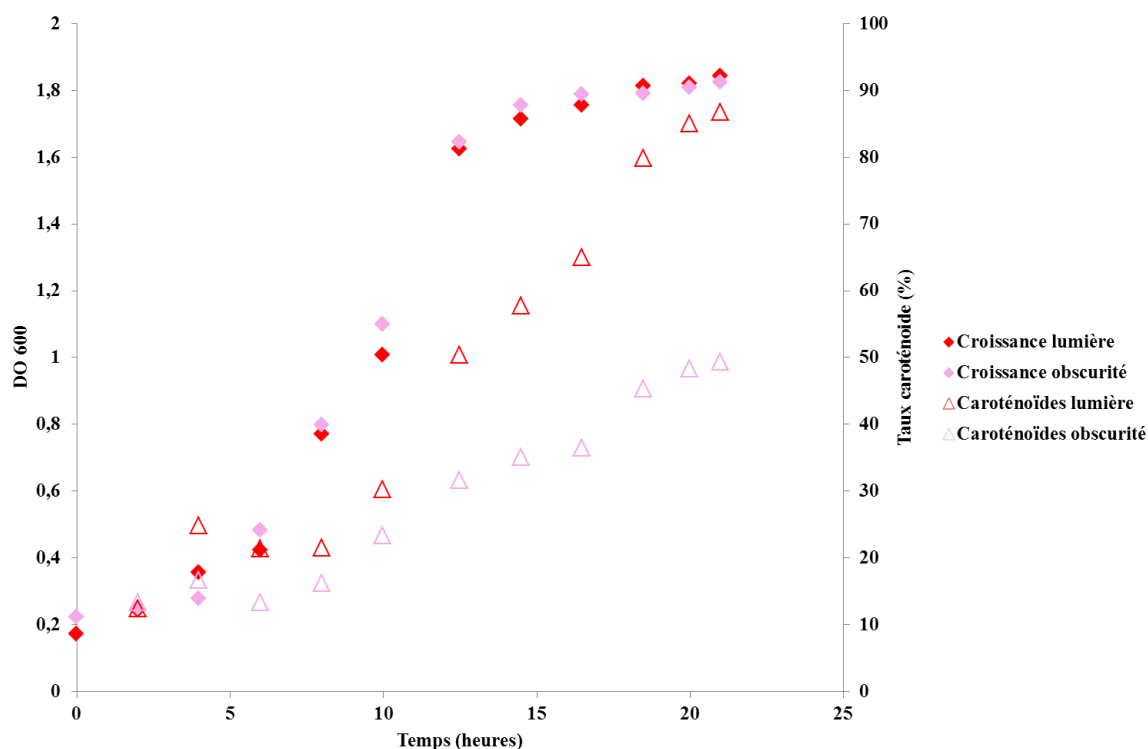


Figure III-48 : Influence de la lumière sur la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* et sur la production de caroténoïdes en milieu Marine Broth, à 30°C et sous une agitation de 150 rpm.

Les profils des courbes de croissance ont été identiques en présence ou non de lumière (Figure III-48). La lumière n'a donc pas d'effet sur la cinétique de croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni*. Par contre, celle-ci a un effet stimulant sur la production de caroténoïdes. En effet, le ratio caroténoïdes/biomasse calculé de la façon suivante : $\% \text{ caroténoïdes} = (\text{DO}_{480}/\text{DO}_{620}) \times 100$, était de manière générale plus élevé en présence de lumière. Cette tendance s'est dégagée légèrement dès le début de la phase exponentielle de croissance, c'est-à-dire après environ 6 heures de culture. L'écart entre les taux de caroténoïdes s'est creusé réellement à la 13^{ème} heure de culture ce qui correspond au début de la phase stationnaire où le taux de caroténoïdes est d'environ 30% dans l'obscurité et 50% en présence de lumière. La production de caroténoïdes est favorisée en présence de lumière, ce qui n'est pas surprenant car ces composés sont déjà connus pour avoir un rôle contre le stress photo-oxydant chez les cyanobactéries (Boulay et al., 2008). Leur rôle de protection contre les dommages causés aux organismes vivants par la lumière est essentiel. En effet, l'énergie lumineuse, associée à l'oxygène est le principal initiateur de l'oxydation via la formation de radicaux libres. De plus, c'est lorsque la bactérie est en phase stationnaire de croissance qu'elle a produit le plus de caroténoïdes, ce qui pourrait être une indication que ces caroténoïdes ont également un rôle face à une situation de stress tel le stress nutritif. La surproduction de caroténoïdes en condition de stress nutritif a déjà été démontré chez certaines algues vertes (Vidhyavathi et al., 2008).

Une des conditions permettant d'obtenir une forte production de caroténoïdes a été d'atteindre la phase stationnaire de croissance ce qui revient à se placer en condition de stress pour les cellules bactériennes (ici, en partie due à un stress nutritif). La lumière, certainement considérée comme une source de stress par *Algoriphagus yeomjeoni*, a également permis d'augmenter la production de caroténoïdes.

Une autre source de stress connue pour les cellules bactériennes a été testée sur la production de caroténoïde, la présence d'oxygène. Un barbotage de dioxygène a été réalisé ou non tout le long du suivi de la croissance et de la production des caroténoïdes.

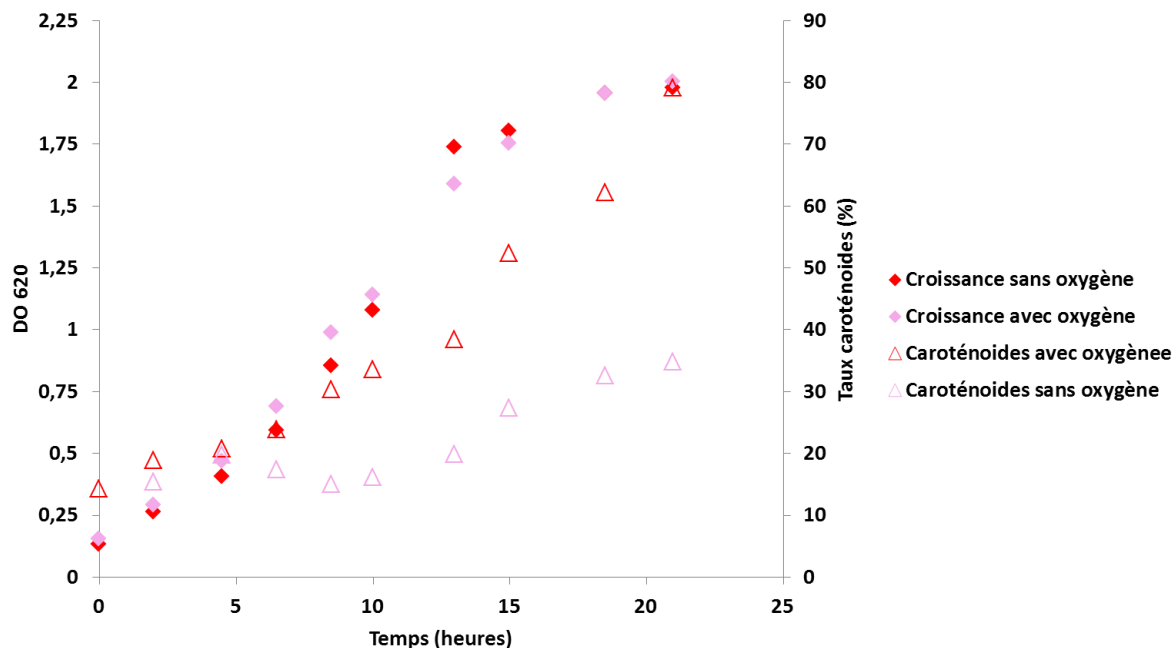


Figure III-49 : Influence de l'aération sur la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* et sur sa production de caroténoïdes en milieu Marine Broth, à 30°C.

L'oxygénation forcée n'a pas eu d'influence sur la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* (Figure III-49). Cependant, les caroténoïdes ont été produits en plus grande quantité lors d'une aération forcée. En fin de culture ($t = 20$ h), il y a une différence d'un facteur deux dans la production de caroténoïdes selon qu'il y ait ou non une aération forcée, soit un taux de caroténoïdes respectivement de 80 et 40%. Il a été très récemment montré que certaines bactéries marines, dont certaines appartenant au même phylum qu'*Algoriphagus* : le phylum Bacteroidetes, produisent des caroténoïdes possédant des activités antioxydantes (Shindo & Misawa, 2014). À un stade précoce de l'oxydation, les caroténoïdes peuvent bloquer les composés initiateurs d'oxydation (radiations UV, métaux de transition, réactifs chimiques...) et ainsi empêcher la formation des espèces réactives de l'oxygène. Si des espèces réactives de l'oxygène ont malgré tout été formées, la structure des caroténoïdes permet de les piéger, en particulier l'oxygène singulet, protégeant ainsi la cellule (Sachindra et al., 2007). Cet effet antioxydant présente un avantage pour toutes les espèces aérobies. Lorsque l'oxydation est déjà initiée, les caroténoïdes peuvent interrompre la propagation en piégeant les radicaux libres formés. Au niveau des membranes, par exemple, les caroténoïdes empêchent leur dénaturation et leur déstructuration (Britton, 1995).

Les caroténoïdes ont surtout été produits en réponse à un stress, qu'il soit nutritif ou (photo)oxydant.

III.3) Optimisation de la colonisation de l'acier inoxydable par *Algoriphagus yeomjeoni*

La colonisation de l'électrode est un paramètre important pour mettre en œuvre plus rapidement une production de courant et améliorer les performances électrochimiques (Lapinsonniere et al., 2013) des biocathodes d'autant plus quand le milieu réactionnel ne permet pas ou peu la croissance des microorganismes servant d'inoculum.

Les suivis de colonisations ont été effectués comme décrit dans le paragraphe II.2.2.c). Ils ont été réalisés en milieu Marine Broth ainsi qu'en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines. Différentes modifications de la surface pouvant améliorer la colonisation de l'acier inoxydable par *Algoriphagus yeomjeoni* ont été testées. Ainsi des coupons ayant ou non subi des modifications ont été utilisés : des coupons d'acier inoxydable 254SMO « brut » (n'ayant subi aucun traitement de surface), microstructurés (traitement mécanique par sablage) ou ayant subi un traitement chimique (« coating » de poly-L-lysine ou de glucose). Afin de pouvoir effectuer des études en temps réel sur la formation de biofilm à la surface des électrodes il serait judicieux qu'*Algoriphagus yeomjeoni* puisse être observable par microscopie sans utiliser des techniques de marquage qui sont létales pour les bactéries. Ainsi, une transformation de la souche bactérienne, avec un plasmide contenant un gène pour une protéine fluorescente, a été réalisée. Un dispositif expérimental, qui a été décrit dans le paragraphe II.2.c), a également été mis au point afin de rendre possible le suivi de la colonisation en temps réel.

III.3.1) Transformation d'*Algoriphagus yeomjeoni*

Un gène permettant l'expression d'une protéine autofluorescente observable sous microscope en épifluorescence a été introduit dans la cellule bactérienne. Ce gène est appelé *gfp* (green fluorescent protein) et est porté par un plasmide (c'est-à-dire un fragment d'ADN circulaire non indispensable à la survie de la cellule). La grande majorité des plasmides sélectionnés pour un transfert horizontal de gènes provient de l'espèce bactérienne *Escherichia coli*. Néanmoins, le plasmide choisi pour cette étude, est un plasmide extrait d'un microorganisme appartenant au même phylum qu'*Algoriphagus yeomjeoni* (Bacteroidetes), *Flavobacterium hibernum* afin d'éviter des problèmes liés aux systèmes de restriction. Les Systèmes de Restriction et Modification (SMR) sont propres aux procaryotes (Roberts & Macelis, 1997). Un de leur rôle est la protection cellulaire contre l'ADN allogène. En effet, pour protéger la cellule il faut être capable de distinguer l'ADN propre de l'ADN allogène (par exemple, provenant d'un microorganisme phylogénétiquement éloigné). En effet, il a été démontré que les plasmides provenant de *Flavobacterium hibernum* sont plus efficacement transférés dans *Flavobacterium hibernum* que ceux provenant d'*Escherichia coli*. Cela indique qu'il existe une barrière de restriction entre ces deux espèces (Chen et al., 2007). Suite à la prise de contact avec le Docteur Nelson, le plasmide pAS43 nous a été gracieusement fourni par l'Université de Rhode Island U.S.A. La construction de pAS43 a commencée à partir d'un « vecteur navette » *E.coli* - *Flavobacterium* pCP29 contenant un gène de résistance à la céfoxitine, à la tétracycline et à l'ampicilline. Avec l'ajout du gène GFPmut1 qui ne possède pas de promoteur, pCP29 est devenu pAS29. Enfin, lorsqu'on place le promoteur fort PompA en amont du gène GFPmut1, on obtient le plasmide pAS43 (Staroscik et al., 2008).

Le transfert du plasmide pAS43 dans *Algoriphagus yeomjeoni* a été effectué par électroporation comme décrit dans le paragraphe II.2.2.b). Techniquement un champ électrique a été appliqué sur les membranes qui sont ainsi déstabilisées. L'ADN présent dans

l'espace extracellulaire peut alors rentrer dans les cellules en migrant vers le pôle positif de la charge, étant lui-même chargé négativement. Un gène de résistance à un antibiotique (dont on sait que la souche est sensible) est présent sur le plasmide. Ainsi, seul les « transformants », c'est-à-dire les cellules bactériennes ayant acquis le plasmide, pourront se développer en sa présence. L'antibiotique est nécessaire comme pression de sélection afin que les « transformants » conservent le plasmide et que celui-ci se transmette à leur descendance. Ainsi, seuls les transformants arrivent à croître sur le milieu Marine Agar supplémenté en ampicilline (Figure III-50). Ces transformants représentent donc les microorganismes ayant incorporé le plasmide et pouvant synthétiser la protéine Gfp.

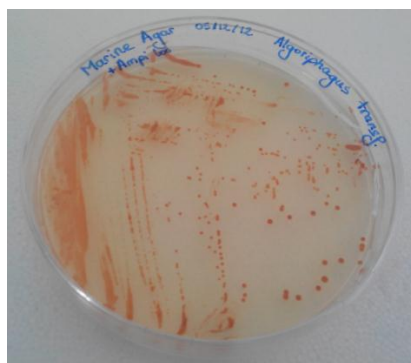


Figure III-50 : *Algoriphagus yeomjeoni* transformés et isolés sur milieu gélosé Marine Agar supplémenté en ampicilline à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ après électroporation.

Afin d'évaluer la fluorescence émise par la Gfp chez les transformants, un test de colonisation sur 24 heures a été réalisé avec un coupon d'acier inoxydable 254SMO en milieu Marine Broth dilué au 1/3 placé dans le dispositif expérimental. Le protocole suivi est le même que présenté dans le paragraphe II.2.2.c). Au bout de 24 heures d'expérimentation, ce coupon est observé au microscope en épifluorescence puis il subit un marquage à l'acridine orange avant une nouvelle observation microscopique (Figure III-51). Le bon fonctionnement de la Gfp est alors jugé en comparant la quantité de cellules observées avant et après le marquage cellulaire à l'acridine orange.

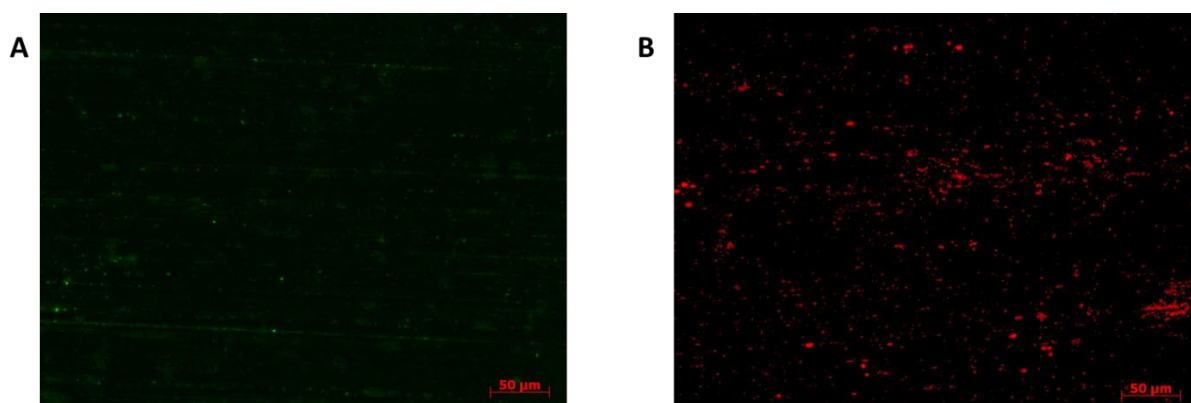


Figure III-51 : Observation en microscopie en épifluorescence de la surface de coupons en acier inoxydable exposés 24 heures à une culture d'*Algoriphagus yeomjeoni* contenant le plasmide pAS43 (A) et après marquage à l'acridine orange (B) en milieu Marine Broth dilué au 1/3.

Sur les observations microscopiques, une différence nette du nombre de cellules adhérentes a été constatée avant et après le marquage à l'acridine orange (Figure III-51). En effet, le

nombre de bactéries adhérentes sur le coupon d'acier inoxydable semble plus important après un marquage à l'acridine orange qu'avant, où les microorganismes ne sont observables que par leur autofluorescence. Le taux de recouvrement de la surface des coupons d'acier inoxydable calculé avec le logiciel Axiovision le confirme. Ainsi, le taux de recouvrement est de 15 % après le marquage à l'acridine orange alors qu'il n'est que de 3 % si on considère uniquement les bactéries exprimant la Gfp.

L'intensité de fluorescence n'est pas homogène et celle-ci est très faible concernant une partie de la population microbienne. La fluorescence émise par la Gfp est connue pour avoir certaines limitations qui sont : la formation post-traductionnelle lente du chromophore, le besoin en oxygène, et la difficulté de distinguer la Gfp lorsque celle-ci n'est pas densément localisée ou fortement exprimée (Zimmer, 2002).

Cette hétérogénéité concernant l'intensité de la fluorescence ne nous permet pas de pouvoir évaluer correctement la colonisation des coupons d'acier inoxydable en temps réel. Les tests de colonisation ne se feront donc pas en temps réel.

III.3.2) Mise en place et développement d'un test de colonisation

Le suivi de la colonisation ne pouvant pas s'effectuer en temps réel, plusieurs coupons d'acier inoxydable ont été placés dans la chambre de contact du dispositif expérimental (Figure III-52) afin d'être récupérés à 4 temps de prélèvement soit 2,6, 16 et 24 heures.

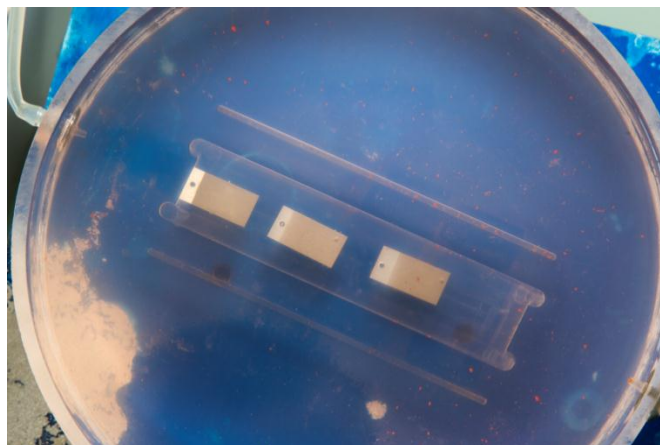


Figure III-52 : Coupons d'acier inoxydable placés dans le dispositif expérimental. Les coupons ont été disposés dans une anfractuosité prévue à cet effet et dans l'alignement du flux hydrodynamique créé par la pompe péristaltique.

Le suivi de la colonisation a tout d'abord été mené en milieu Marine Broth dilué au 1/3.    t = 0, c'est-à-dire au démarrage de l'expérience, les coupons ont été immergés dans le bassin du dispositif expérimental contenant le milieu Marine Broth dilué au 1/3 et inoculé avec *Algoriphagus yeomjeoni* pour que la densité cellulaire soit d'environ $8,8.10^7$ cellules.mL⁻¹ (DO_{620nm}    0,062).

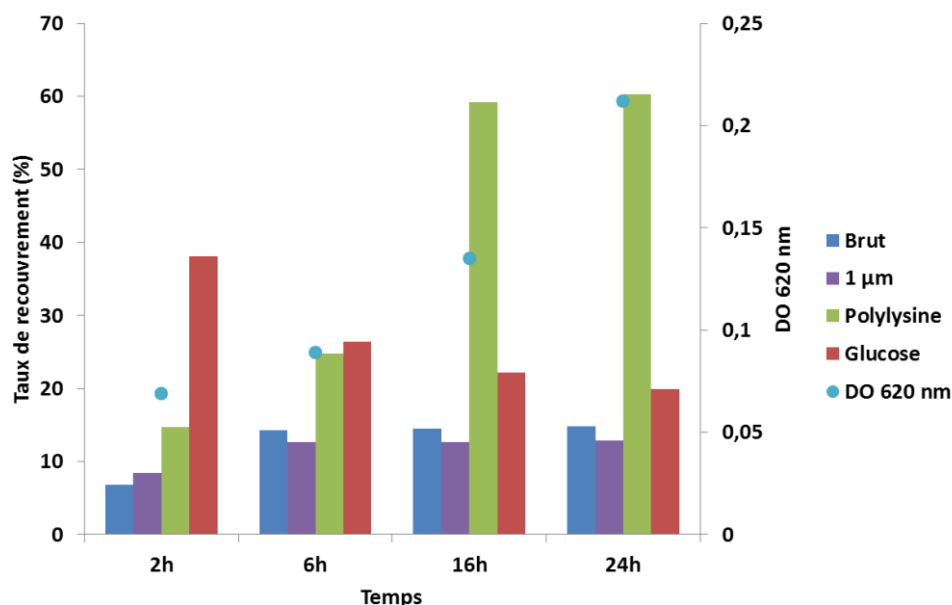


Figure III-53 : Cinétique de colonisation d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur de l'acier inoxydable 254SMO ayant subi ou non un traitement mécanique (microstructuration de 1 µm) ou chimique (« coating » de poly-L-lysine ou de glucose) sur 24 heures en milieu Marine Broth dilué 1/3.

Les coupons d'acier inoxydable témoins, non inoculés, ne présentent pas de fluorescence. Ni le support en acier inoxydable lui-même ni les traitements mécaniques ou chimiques n'ont interféré avec les mesures de fluorescence. Les résultats des expériences de colonisation réalisées en milieu Marine Broth 1/3 sont donc interprétables.

Les coupons d'acier inoxydable « brut », ceux qui n'ont pas reçu de traitement qu'il soit mécanique ou chimique, ont été analysés en premier. Ils ont servi de base afin d'évaluer l'influence des différents traitements apportés à la surface de certains coupons d'acier inoxydable. En 2 heures, le taux de recouvrement de la surface des coupons en acier inoxydable a atteint environ 6% (Figure III-53). Il a atteint environ 15% vers 6 heures et stagne à cette valeur jusqu'à la fin des expérimentations. Entre la 6^{ème} et 24^{ème} heure d'expérimentation, le taux de recouvrement des coupons stagne alors que population planctonique continue d'augmenter. L'hypothèse qui peut être émise afin d'expliquer ce phénomène est que la maturation du biofilm s'est établie dans un laps de temps de 6 heures et qu'un équilibre a été atteint entre le relargage cellulaire et le transport des bactéries à la surface de l'acier inoxydable.

La colonisation d'un support comprend deux partenaires. La souche bactérienne et la surface du support ont tous les deux une influence sur la colonisation. Différents traitements de surface ont été réalisés sur les coupons d'acier inoxydable. Quels ont été les effets de ces traitements sur la colonisation de l'acier inoxydable par *Algoriphagus yeomjeoni* ?

Un des traitements est un traitement mécanique par sablage qui a créé des microstructurations d'environ 1 µm de diamètre en surface de l'acier. Au vu des résultats obtenus, similaires à ceux obtenus sur acier « brut », les microstructurations n'ont pas semblé influencer la colonisation bactérienne. L'influence des caractéristiques topographiques des surfaces sur l'adhésion bactérienne reste mal comprise. La rugosité de surface, qui est le paramètre le plus couramment utilisé pour définir la topographie de surface, ne semble pas influencer de manière

constante sur l'adhésion bactérienne (Perera-Costa, et al., 2014). Cela peut s'expliquer par le fait que l'effet de la rugosité de surface dépend de la taille des microstructurations et de la taille des microorganismes (Whitehead et al., 2005). Les microstructurations de 1 μm en surface de l'acier ne sont peut-être pas assez larges pour accueillir les cellules bactériennes d'*Algoriphagus yeomjeoni* qui ont une taille de 0,4-0,7 x 1,5-2,5 μm selon Yoon et al.

Dans le cas du traitement de la surface à la poly-L-lysine, l'influence sur la colonisation a été clairement visible. La colonisation du support a augmenté au cours du temps ; en 2 heures le taux de recouvrement a atteint environ 15 % et est passé à 60 % au bout de 16 heures. Le taux de recouvrement a fait un bond entre 6 et 16 h, moment où se produit une augmentation plus importante de la densité bactérienne planctonique (DO 620 nm : 0,089 à 0,135). La poly-L-lysine est une substance connue pour apporter des charges positives en surface du support sur lequel elle est appliquée. Ces charges positives apportées à la surface des coupons d'acier inoxydable jouent un rôle dans l'attraction électrostatique entre les cellules bactériennes, considérées comme des particules chargées négativement, et la surface chargée positivement des coupons (Schwieger & Blume, 2007). L'adhésion a longtemps été vue par les microbiologistes comme un phénomène quasi-exclusivement biologique, en liaison avec les structures pariétales des microorganismes. D'un point de vue biologique, il a été démontré chez de nombreux genres et espèces, que certains appendices des bactéries sont impliqués dans l'adhésion tels que les flagelles (Dietrich et al., 2001) et les pili (Stone & Abu Kwaik, 1998). Cependant, l'adhésion fait également intervenir des interactions physico-chimiques, dont les interactions chimiques telles que les forces électrostatiques ; qui conduisent à un rapprochement des cellules vers le support (van Loosdrecht et al., 1990).

Concernant le coating de glucose, la colonisation des électrodes a été très forte et très rapide avec un taux de recouvrement de 40 % en 2 heures. Puis, le taux de recouvrement a diminué au cours du temps. En effet, le taux de recouvrement est passé d'environ de 40% à 20% entre 2 et 24h. *Algoriphagus yeomjeoni* n'étant pas une espèce bactérienne flagellée (Yoon et al., 2005), le glucose n'a donc pas joué le rôle de chimio attractant (Kirov, 2003). Cependant, comme le montre les deux premières heures de colonisation, le film de glucose a permis d'obtenir une surface plus adhésive que la surface « brut » de l'acier. Le « coating » de glucose pourrait jouer le rôle d'EPS et engluier les bactéries à la surface des coupons d'acier inoxydable. Ces EPS sont par ailleurs principalement constitués de saccharides dont fait partie le glucose (Underwood & Paterson, 2003). Toutefois, l'effet a été de courte durée, la cinétique de colonisation n'a fait que diminuer au cours du temps. Le « coating » de glucose n'était pas immobilisé à la surface du coupon et a probablement disparu au cours de l'expérience.

En milieu Marine Broth dilué au 1/3, le taux de recouvrement en 24 heures sur acier « brut » n'a pas excédé les 15 %, tout comme sur l'acier microstructuré. Dans ces conditions, la microstructuration n'a donc pas d'impact sur la colonisation de l'acier inoxydable par *Algoriphagus yeomjeoni*. Au contraire de la poly-L-lysine qui a favorisé la colonisation du support en acier inoxydable par la création d'interactions électrostatiques entre celui-ci et *Algoriphagus yeomjeoni* et ce dès les premières heures d'expérimentation. Concernant le « coating » de glucose, un effet positif très marqué a été observé les premières heures puis cet effet s'est estompé.

Les mêmes expérimentations ont été renouvelées non plus en milieu riche (Marine Broth) mais en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines, milieu utilisé lors des expérimentations électrochimiques. Rappelons ici que ce milieu ne permet pas la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* en 48 heures. Pour opérer dans des conditions se rapprochant de l'expérience en milieu nutritif, la densité cellulaire à $t = 0$ a été ajustée à environ 3.10^8

cellules.ml⁻¹ ($DO_{620nm} \approx 0,212$) ce qui correspond à la densité cellulaire observée au bout de 24 heures lors des expériences menées en milieu nutritif (Marine Broth dilué au 1/3).

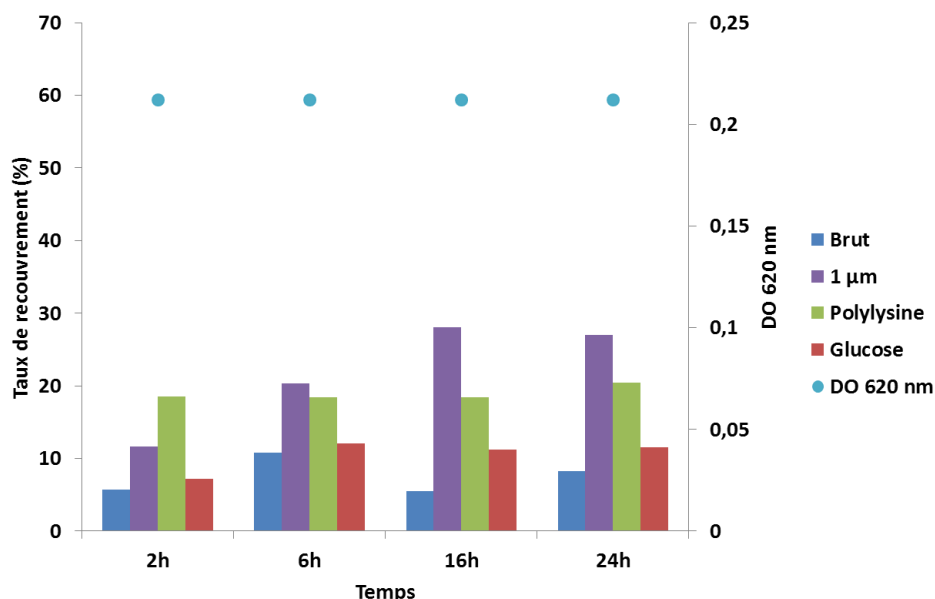


Figure III-54 : Cinétique de colonisation d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur de l'acier inoxydable 254SMO ayant subi ou non un traitement mécanique (microstructuration 1µm) ou chimique (« coating » de poly-L-lysine ou de glucose) sur 24 heures en eau de mer synthétique.

Les coupons d'acier inoxydable témoins ne présentent aucune fluorescence, les suivis de colonisation réalisés en eau de mer synthétique sont donc interprétables.

L'eau de mer synthétique supplémentée en vitamines ne permettant pas la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni*, le recouvrement de la surface des coupons en acier inoxydable ne peut être dû que par l'adhésion des bactéries planctoniques.

L'évolution de la colonisation sur les coupons d'acier « brut », est similaire à celle observée en milieu riche pendant les 6 premières heures. En effet, une amélioration du taux de recouvrement : de 5 à 10% a été constaté entre 2 et 6 heures (Figure III-54). Cependant, contrairement à l'expérience menée en milieu riche, le taux de recouvrement ne s'est pas stabilisé mais a plutôt tendance à diminuer. Le plateau observé en milieu riche était expliqué par un équilibre entre le détachement cellulaire et la colonisation par les cellules planctoniques ainsi que la multiplication des cellules adhérentes. Par contre, du fait de l'absence de croissance bactérienne possible en eau de mer synthétique, cet équilibre a été déplacé en faveur du détachement cellulaire et il en résulte une légère baisse du nombre de bactéries adhérentes aux coupons d'acier « brut » à partir de la 6^{ème} heure d'expérimentation.

Le taux de recouvrement des coupons microstructurés a augmenté au cours du temps : de 10 à 30% entre 2 et 16 heures. Puis celui-ci semble s'être stabilisé entre 16 et 24 heures. Précédemment, en milieu Marine Broth, le taux de recouvrement excédait à peine les 10% de couverture. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les microstructurations provoquent des irrégularités de propriétés de surface de l'acier inoxydable. Les charges de surface et/ou l'hydrophobicité pouvant être modifiées localement par le traitement mécanique favorisent l'adhésion des cellules bactériennes. Toutefois, ceci n'est valable qu'en eau de mer synthétique. En effet, ce phénomène n'a pas été observé en milieu Marine Broth. Le milieu

Marine Broth étant un milieu riche, on peut supposer que le film conditionnant en surface des coupons « gomme » les effets résultant des microstructurations.

Concernant le traitement des surfaces par la poly-L-lysine, l'adhésion a été rapide et le taux de recouvrement était déjà de 20 % et est resté inchangé tout au long de l'expérience. Cela implique que l'effet des charges positives en surface de l'acier inoxydable a été effectif avant le premier prélèvement de coupon qui est réalisé 2 heures après le démarrage de l'expérience. Le fait qu'un taux de recouvrement « maximum » ait été atteint en moins de deux heures est probablement dû à la limitation du nombre de cellules planctoniques contrairement à l'expérience réalisée en milieu Marine Broth. Toutefois, en eau de mer synthétique, la poly-L-lysine a également favorisé la colonisation des coupons d'aciers. En effet, en présence de celle-ci le taux de recouvrement a quasiment été doublé. Cependant, l'effet de la poly-L-lysine était encore plus marqué en milieu Marine Broth qu'en eau de mer synthétique. Ceci peut s'expliquer par l'absence de croissance en eau de mer synthétique. En effet, en milieu MB les 60% de recouvrement peuvent être atteints grâce à l'augmentation de la population planctonique et en partie grâce à la multiplication des cellules adhérentes au support en acier inoxydable.

Enfin, pour le traitement de surface par un « coating » de glucose, contrairement à ce qui avait été observé en milieu Marine Broth, le taux de recouvrement a augmenté pendant les 6 premières heures où il a atteint environ 12%. À partir de ce moment, le taux de recouvrement n'a plus évolué. En milieu Marine Broth, le taux de recouvrement en fin d'expérimentation était de 20 % soit presque deux fois plus qu'en eau de mer synthétique. L'eau de mer synthétique étant un milieu « pauvre », les taux de recouvrement plus faibles obtenus dans ce milieu peuvent s'expliquer par une disparition plus rapide du « coating » de glucose. En effet, celui-ci pourrait être plus rapidement dilué en eau de mer synthétique qu'en milieu MB.

Du fait de l'absence de croissance en eau de mer synthétique, les taux de recouvrement obtenus dans ce milieu ont été plus faibles qu'en milieu Marine Broth sauf dans le cas de l'acier inoxydable microstructuré. En effet, les microstructurations ont favorisé la colonisation des coupons d'acier inoxydable uniquement en eau de mer synthétique. Le traitement ayant eu un effet favorable sur la colonisation, que les expérimentations se déroulent en milieu Marine Broth ou en eau de mer synthétique, a été le traitement chimique à la poly-L-lysine. Cependant, en eau de mer synthétique, milieu où les expériences électrochimiques ont été effectuées, le taux de recouvrement n'a pas dépassé les 30% en 24 heures d'expérience quel que soit le coupon d'acier inoxydable utilisé. Cette colonisation plus faible est principalement due au fait que l'eau de mer synthétique ne permet la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni*.

Le meilleur traitement afin de favoriser la colonisation de l'acier inoxydable par *Algoriphagus yeomjeoni* est un coating de poly-L-lysine.

III.4) Propriétés électroactives d'*Algoriphagus yeomjeoni*

Une souche bactérienne électroactive a été isolée à partir de biofilms marins et a été identifiée comme *Algoriphagus yeomjeoni*. Cette souche, dans des conditions de laboratoire recréant celles du milieu marin (batch en eau de mer naturelle), a formé des biofilms électroactifs pouvant fournir jusqu'à 100 mA.m⁻² (Figure III-43). Cela fait d'*Algoriphagus yeomjeoni* un modèle de souche pure pour la catalyse de la réduction du dioxygène. A partir de ces résultats, le projet BioCathInox a vu le jour avec pour objectif d'étudier la réduction du dioxygène sur acier inoxydable catalysée par des bactéries marines aérobies et plus particulièrement avec la souche *Algoriphagus yeomjeoni* qui va servir de modèle d'étude. De manière générale, au LGC, les expériences ont toujours été menées en eau de mer naturelle de différentes provenances : eau de Gêne en Italie, de Narbonne et de La Tremblade en France. Cependant, l'eau de mer naturelle est un milieu dont la composition n'est pas maîtrisée. En effet, sa composition peut varier selon le lieu de prélèvement et les conditions climatiques. Pour limiter ces variations non maîtrisées et pouvoir contrôler la composition réelle du milieu réactionnel, un des objectifs important est de mener les expérimentations en milieu eau de mer synthétique supplémentée en vitamines. La composition des différentes solutions composant l'eau de mer synthétique supplémentée en vitamines a été précisément décrite dans le paragraphe II.2.1). La démarche concernant la variation des différents paramètres tels l'inoculum, le milieu réactionnel ou le pH a été expliquée au fur et à mesure de la présentation des résultats électrochimiques. Les différents essais ont été regroupés dans le Tableau III-14. Ayant démontré précédemment qu'*Algoriphagus yeomjeoni* a une température optimale de croissance de 30°C, ce paramètre est resté fixe durant les différentes expérimentations électrochimiques. Un réacteur témoin a été réalisé en parallèle de chaque test. Les témoins ont été effectués dans les mêmes conditions que pour les différents essais présentés dans le Tableau III-14 mais sans inoculer les réacteurs.

Tableau III-14 : Détails des conditions expérimentales testées pour chaque essai électrochimique mené avec la souche *Algoriphagus yeomjeoni*. (MB : Marine Broth)

	Précultures	Milieu réactionnel	pH	Aération	Durée
Test 1	MB 1/10	Eau mer synthétique + vitamines	8	Bullage air	8 jours
	MB 1/3				
	colonie				
Test 2	MB 1/10	Eau mer synthétique + vitamines	8	Agitation mécanique 300 rpm	8 jours
	MB 1/3				
	colonie				
Test 3	MB 1/3	Eau de mer synthétique + vitamines + minéraux	8	300 rpm	55 jours
Test 4	MB 1/3	Eau de mer synthétique + vitamines + minéraux	8, 6, 4, 2	300 rpm	8 jours
Test 5	MB 1/3	Eau de mer synthétique autoclave + vitamines + minéraux	8	300 rpm	7 jours
		Eau de mer synthétique filtrée + vitamines + minéraux			
Test 6	MB 1/3	Eau de mer synthétique + vitamines + minéraux	8	300 rpm	15 jours 1 mois
Test 7	MB 1/3	Eau de mer naturelle filtrée	8	300 rpm	7 jours

III.4.1) Test 1

Pour le premier essai et comme le montre le [Tableau III-14](#), l'idée était de tester des inocula de plus en plus pauvres en nutriments. En effet, certains des composants du milieu MB pourraient servir de donneurs d'électrons. Etant donné que la réaction que les microorganismes doivent catalyser en surface de la cathode est une réaction de réduction cela implique que ceux-ci doivent accepter les électrons fournis par la cathode. Or, s'il y a des donneurs d'électrons autres que la cathode dans le réacteur électrochimique cela pourrait empêcher le transfert électronique entre les microorganismes et l'électrode. C'est pourquoi les expériences se déroulent en eau de mer synthétique ou naturelle. Cependant, la transition de la préculture en milieu « riche » vers le réacteur bioélectrochimique contenant un milieu « pauvre » pourrait causer un choc pour les cellules bactériennes. Afin de voir l'impact de la « richesse » du milieu de la préculture sur les expériences électrochimiques, plusieurs précultures ont été préparées dans des milieux où la « richesse » en nutriments est de plus en plus pauvre : milieu Marine Broth dilué au 1/3 et au 1/10. De plus, une inoculation à partir de colonies a également été réalisée. Cette inoculation n'apporte pas de milieu et permet d'éviter le problème des donneurs d'électrons. Ainsi, des colonies ont été prélevées sur le milieu solide Marine Agar et ont servi à ensemercer un des réacteurs bioélectrochimiques.

Le dioxygène étant le composé que les microorganismes doivent réduire, un barbotage d'air a été mis en place dans les réacteurs dès l'inoculation de ceux-ci.

Quel que soit le type de préculture utilisée pour l'inoculation de réacteurs aucun courant de réduction n'a été observé durant les 8 jours de tests.

En complément, des résultats de voltammétrie cyclique du témoin (non inoculé) et d'un essai (celui avec l'inoculum en milieu MB 1/10) laissent entrevoir une très légère différence peu significative de la catalyse de la réduction du dioxygène par les microorganismes en comparaison de celle due spécifiquement au matériau de l'électrode, l'acier inoxydable (Figure III-55).

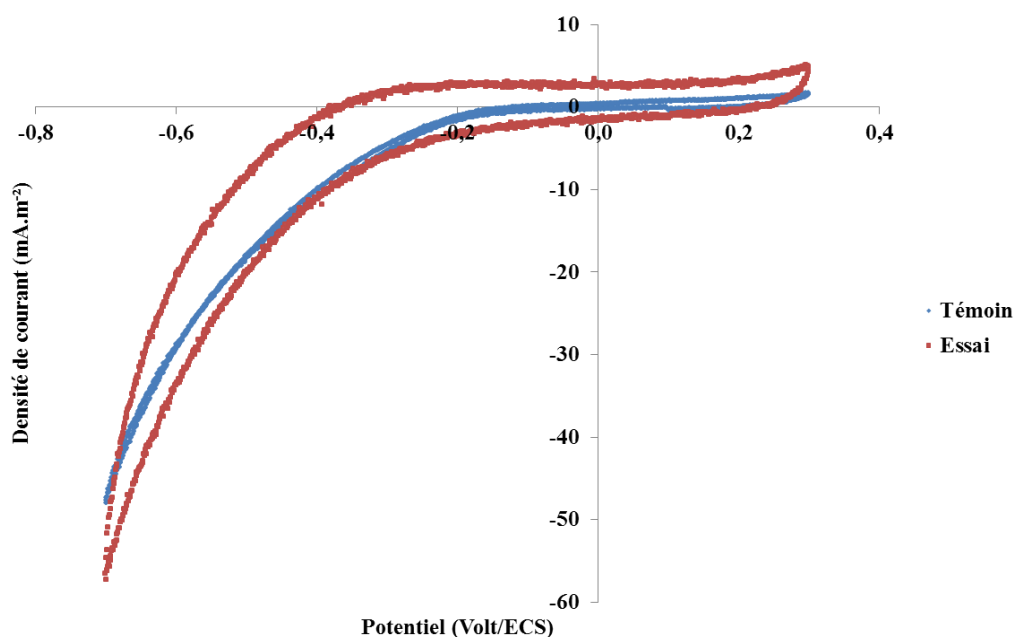


Figure III-55 : Voltammogramme sur acier inoxydable 254SMO avec un balayage du potentiel entre - 0,7 et + 0,3V/ECS.

III.4.2) Test 2

Lors de la 2^{ème} campagne d'essais, les conditions expérimentales étaient quasiment identiques à l'exception de l'aération du milieu. Celle-ci n'était plus assurée par un barbotage d'air mais par une agitation mécanique de 300 rpm. Ainsi, une plaque agitante immergeable a été paramétrée afin que les barreaux aimantés présents dans les réacteurs puissent fournir une vitesse d'agitation de 300 rpm assurant ainsi une meilleure diffusion de l'air ambiant dans le milieu mais surtout provoquant une hydrodynamique pouvant améliorer le transfert de matière (dioxygène) au sein du système électrochimique.

La quantité d'oxygène dissous a été mesurée à l'aide d'une sonde à oxygène dans deux réacteurs placés dans les conditions opératoires utilisées lors des expérimentations électrochimiques, soit à une température de 30°C, en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines mais sans les inocula bactériens. Le milieu d'un des réacteurs était en condition stagnante et le milieu de l'autre réacteur a été soumis à une agitation de 300 rpm. Les quantités de dioxygène dissous mesurées étaient respectivement de 6,4 mg.L⁻¹ et de 7,6 mg.L⁻¹. L'agitation a donc permis d'augmenter la quantité de dioxygène dissous dans les réacteurs.

Les résultats obtenus sont les mêmes que pour l'expérience précédente. Aucune densité de courant n'a été observée en chronoampérométrie et aucune catalyse d'une réaction de réduction n'a pu être mise en évidence en voltammétrie cyclique. L'aération du milieu, obtenue par bullage ou agitation, ne semble pas être la cause de l'absence de courant. Le seul changement entre ces expériences et celles précédemment réalisées au LGC, où des densités de courant jusqu'à 100 mA.m⁻² avaient été obtenues (Figure III-43), correspond au changement de milieu. L'absence de courant s'expliquerait-elle alors par l'utilisation d'eau de mer synthétique ?

L'eau de mer naturelle est beaucoup plus complexe en composition que l'eau de mer synthétique. Elle contient notamment une grande diversité d'éléments traces tels que le cuivre, le zinc, le fer... Ces métaux présents en très faible quantité sont peut-être à l'origine du problème si le transfert électronique entre *Algoriphagus yeomjeoni* et la cathode fait intervenir les cytochromes. Les cytochromes sont des coenzymes intermédiaires de la chaîne respiratoire. Ils ont comme caractéristique commune d'être constitués d'une porphyrine comportant un atome de fer ou de cuivre. C'est ce dernier qui confère au coenzyme ses propriétés oxydoréductrices en changeant de valence, par exemple : $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$.

Dans cette optique, et pour vérifier cette hypothèse, un nouveau test a été réalisé en supplémentant l'eau de mer synthétique avec une solution de micronutriments contenant, parmi une large liste, du fer et du cuivre. La composition de cette solution a été détaillée dans le paragraphe II.2.1) Milieux de culture.

III.4.3) Test 3

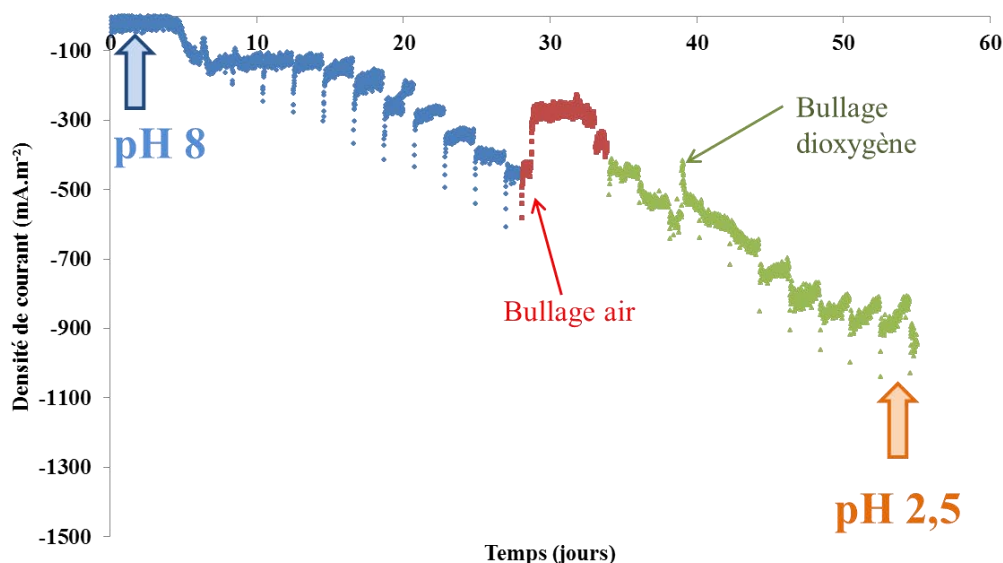


Figure III-56 : Evolution du courant en fonction du temps sur une électrode de 25 cm² en acier inoxydable polarisée à -0,2V/ECS et immergée en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines et micronutriments.

Avec l'ajout de micronutriments, un courant de réduction sur une électrode en acier inoxydable a été observé (Figure III-56). Le démarrage du courant de réduction a été observé au 5^{ème} jour d'expérimentation. Ces 5 jours de latence étaient probablement nécessaires afin que la colonisation de l'électrode soit suffisamment importante pour que le signal de réduction soit visible en chronoampérométrie et/ou que le(s) mécanisme(s) de transfert d'électron soi(en)t mis en place par les microorganismes. Le fait que le courant soit apparu dans un réacteur contenant pour la première fois des micronutriments tels que le cuivre et le fer, semble confirmer l'hypothèse du mécanisme de transfert d'électrons à l'électrode par les cytochromes. Le courant s'est stabilisé entre le 6^{ème} et 15^{ème} jour puis a augmenté (en valeur absolue) progressivement pour atteindre presque - 500 mA.m⁻² au 28^{ème} jour. Une augmentation de la densité de courant a été observée après chaque voltammétrie cyclique réalisée. Ainsi, le balayage du potentiel entre - 0,7 et + 0,3 V/ECS favoriserait le transfert électronique entre les microorganismes et l'électrode. Au 28^{ème} jour d'expérimentation, l'agitation a été arrêtée et un bullage d'air a été réalisé dans le réacteur, la densité de courant est alors passée de -500 à -300 mA.m⁻². Lorsque le bullage a été stoppé et que l'agitation à 300 rpm a repris les densités de courant sont repassées progressivement (moins de 10 jours) à - 500 mA.m⁻². Au 39^{ème} jour d'expérimentation, un bullage de dioxygène a été réalisé. Le même constat a pu être observé. Ainsi, ce n'est pas l'apport de dioxygène ni la quantité de dioxygène dissous dans le milieu réactionnel qui est limitant pour la réaction de réduction mais le transfert de masse à l'électrode et surtout au sein du biofilm. Cela signifie qu'une agitation au sein du réacteur est préférable afin d'améliorer les performances électrochimiques. Après 55 jours de polarisation à - 0,2 V/ECS, les densités de courant ont atteint - 900 mA/m². Cependant, la mesure du pH dans le milieu réactionnel a indiqué une valeur de 2,5 contre 8,0 au départ de l'expérience. *Algoriphagus yeomjeoni* n'est pas une bactérie acidophile et ne supporte pas un pH inférieur à 4 (Yoon et al., 2005). La catalyse de la réduction a été réalisée soit de manière abiotique, directement par le matériau, soit de manière biotique par les cytochromes mais sans la présence d'une activité métabolique bactérienne.

Pour vérifier cette dernière hypothèse, l'électrode de travail (la cathode) a été remplacée par une cathode en acier inoxydable « propre », c'est-à-dire non colonisée par des microorganismes.

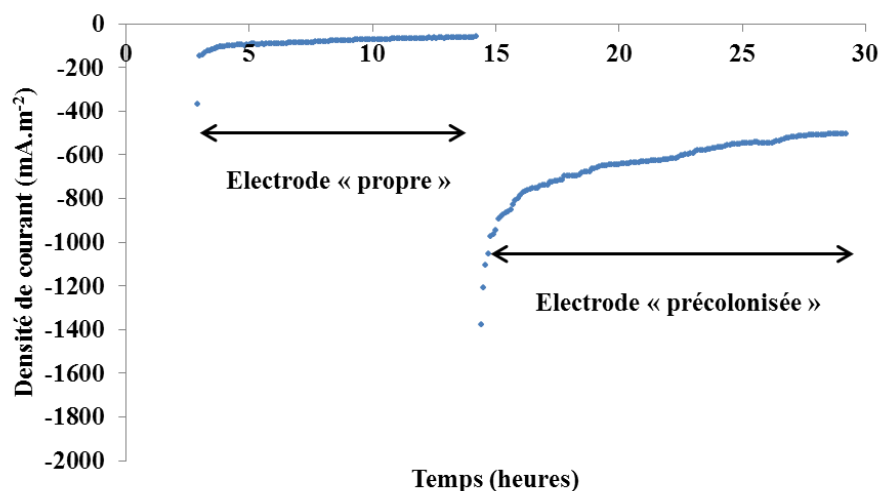


Figure III-57 : Evolution du courant de réduction sur une électrode en acier inoxydable « propre » polarisée à $-0,2\text{V/ECS}$ (sans biofilm) puis sur une électrode en acier inoxydable polarisée à $-0,2\text{V/ECS}$ déjà colonisée par un biofilm d'*Algoriphagus yeomjeoni* (à partir du 15^{ème} jour).

Le courant a alors chuté drastiquement pour avoisiner une valeur quasi nulle, quelques dizaines de mA.m^{-2} (Figure III-57). Et, lorsque l'électrode initiale a été replacée dans le réacteur, un courant de réduction conséquent est réapparu immédiatement. La densité de courant était supérieure à -500 mA.m^{-2} . Cela signifie que le courant qui a été observé jusqu'à présent était bien dû à un système biotique.

Maintenant qu'une piste concernant le mécanisme de transfert a été ouverte il serait intéressant de vérifier si le courant observé correspond bien à la réaction de réduction du dioxygène. Pour cela, l'agitation a été stoppée et le réacteur a été dégazé en continu avec un flux gazeux de diazote.

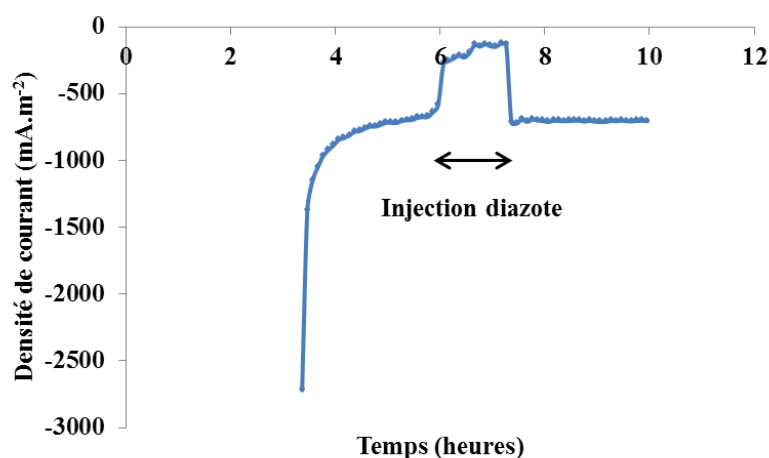


Figure III-58 : Evolution du courant de réduction sur acier inoxydable 254SMO polarisée à $-0,2\text{V/ECS}$ colonisée par un biofilm d'*Algoriphagus yeomjeoni* sous un bullage de diazote entre le 6^{ème} et 7^{ème} jour.

L'injection de diazote s'est déroulée entre le 6 et 7^{ème} jour (Figure III-58). Le diazote a progressivement évacué le dioxygène du milieu réactionnel. Durant cette période, la densité de courant a chuté brutalement autour de valeurs presque nulles confirmant ainsi que la réaction électrochimique catalysée était bien celle de la réduction du dioxygène.

De nouvelles expériences dans les mêmes conditions ont été menées afin de voir la reproductibilité du résultat. Mais aucune production de courant n'a été observée au cours des 3 tentatives successives. Cependant, l'origine de l'échec de ces essais a pu être déterminée. En effet, l'acidification observée au cours de l'essai 3 n'a pas été observée lors des nouvelles tentatives. Ainsi, il a été décidé de renouveler l'expérience toujours dans les mêmes conditions mais à différents pH.

III.4.4) Test 4

Au vu de la surprenante acidification du milieu observée lors du test 3, il est apparu que la réaction de réduction était peut-être initiée à un pH inférieur à 8,0. Ainsi, l'expérience de chronoampérométrie a été reproduite dans les mêmes conditions mais le milieu a été ajusté à différents pH dès le début des expériences à l'aide d'une solution de HCl à 37 %.

Quatre réacteurs ont alors été démarrés en parallèle avec des pH initiaux de 8, 6, 4 et 2. Aucune production de courant n'est apparu au cours des 8 jours de polarisation à - 0,2 V/ECS. Le fait que l'acidification ne soit pas progressive et qu'elle ne soit pas déclenchée par un phénomène intrinsèque au bioréacteur pourrait expliquer cet échec quant à reproduire la production de courant obtenue dans le test 3. Une autre possibilité serait que certains composants du milieu réactionnel ne soient pas disponibles du fait de la possible précipitation de ceux-ci lors de l'autoclavage. Ainsi, la méthode de stérilisation a été modifiée. Au lieu de subir un autoclavage l'eau de mer synthétique ainsi que la solution de micronutriments ont été filtrées.

III.4.5) Test 5

Deux réacteurs ont été réalisés, l'un contenant de l'eau de mer synthétique filtrée et l'autre contenant le même milieu mais ayant subi un autoclavage. Ce changement de mode de stérilisation n'a eu aucun effet sur l'apparition d'un courant de réduction.

Les modifications apportées afin de voir de nouveau apparaître un courant ont été faites sur le milieu réactionnel : sa composition, son pH et sa stérilisation. Mais, le milieu n'est certainement pas l'unique cause de l'absence de densités de courant. En effet, l'arrêt des expériences, lorsqu'aucune densité n'est observée, est peut-être réalisé trop tôt (environ 1 semaine). En effet, lors du test 3 les prémices du courant de réduction sont apparues à partir du 5^{ème} jour et un seul essai ne suffit pas pour en faire une généralité. Ainsi, le test 3 a été reproduit à l'identique mais, même si aucun courant précoce n'apparaît, les expériences vont être poursuivies sur une plus longue durée.

III.4.6) Test 6

L'expérience, telle qu'elle a été menée lors du test 3, a été réitérée en maintenant la polarisation pendant 15 jours puis un mois afin de voir si le temps de latence était plus long

que celui observé la première fois (environ 5 jours). Aucune production de courant n'est apparue.

Après toutes ces tentatives, l'hypothèse que le test 3 n'était qu'un artefact est envisagée. L'eau de mer synthétique même supplémentée en vitamines et micronutriments n'était tout simplement pas adaptée pour qu'*Algoriphagus yeomjeoni* puisse montrer ces propriétés de microorganisme électroactif. Un nouveau lot d'expériences a été alors effectué en eau de mer naturelle filtrée comme historiquement effectuées la fois où cette souche a fourni des densités de courant jusqu'à 100 mA.m^{-2} .

III.4.7) Test 7

Les dernières tentatives ont donc été réalisées dans de l'eau de mer naturelle sans parvenir encore une fois à visualiser une catalyse de la réduction du dioxygène.

III.4.8) Conclusions sur les essais électrochimiques

Malgré tout le temps passé à essayer de trouver une solution pour qu'*Algoriphagus yeomjeoni* puisse réaliser une catalyse de la réduction du dioxygène en milieu synthétique, cela ne s'est produit qu'une seule fois sans pouvoir renouveler cet essai ni même comprendre le facteur à l'origine de l'activité catalytique. En définitive, ce microorganisme semble avoir perdu son électroactivité.

III.5) Conclusions sur ce chapitre et perspectives

Algoriphagus yeomjeoni est un modèle d'étude concernant la catalyse microbienne de la réduction du dioxygène sur acier inoxydable. L'étude de cette souche a été plus particulièrement axée sur sa croissance, sa production de composés redox pouvant intervenir dans le transfert d'électron (les caroténoïdes), sa colonisation de l'acier inoxydable et sur son électroactivité dans un milieu maîtrisé : l'eau de mer synthétique.

La température optimale de croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* a été définie à 30°C et le passage à une température plus élevée a été rapidement préjudiciable pour sa croissance. Ainsi, il a donc été décidé de mener toutes les expériences à 30°C. Concernant les caroténoïdes, composés ayant potentiellement un rôle dans le transfert d'électrons avec la cathode en acier inoxydable, leur production a été favorisée en conditions de stress, spécialement en conditions de stress photo-oxydant. Le milieu réactionnel envisagé pour étudier *Algoriphagus yeomjeoni* dans des bioréacteurs électrochimiques étant l'eau de mer synthétique, la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* dans ce milieu a été étudiée. L'eau de mer synthétique étant un milieu nutritionnellement pauvre, la croissance d'*Algoriphagus yeomjeoni* n'a pas pu être observée sur une période de 48 heures, même en lui apportant des sources de substrats simples de natures différentes.

Du fait de l'absence de croissance observée en eau de mer synthétique, les taux de recouvrement d'électrode en acier inoxydable obtenus dans ce milieu sont généralement plus faibles qu'en milieu riche. Toutefois, un traitement de surface à la poly-L-lysine a permis d'améliorer nettement la colonisation de la surface de l'acier inoxydable par *Algoriphagus*

yeomjeoni. En 24 heures, en comparant à une surface d'acier inoxydable « brut », l'ajout de la poly-L-lysine a permis de doubler le taux de recouvrement de la surface des coupons.

Concernant les expériences électrochimiques, malgré la multiplication des tests et des conditions expérimentales, des densités de courant ont été mesurées lors d'une seule expérience au cours de laquelle une forte baisse du pH a été constatée. Malgré ce pH acide surprenant, les tests de contrôle effectués avec une électrode « propre » sans biofilm ou sous une atmosphère anoxique créée par un bullage de diazote prouvent que la réduction du dioxygène est bien catalysée par un système biotique. Cependant au vu de cette unique expérience il semble qu'*Algoriphagus yeomjeoni* ait perdu son électroactivité. Cette perte d'électroactivité peut être attribuée à la longue conservation d'*Algoriphagus yeomjeoni* en Cryo tubes stockés à - 20°C. Elle peut être également due à un nombre de cultures successives sur milieu riche trop important. En effet, *Algoriphagus yeomjeoni* a été isolé à partir du milieu marin et son électroactivité peut être associée au métabolisme particulier mis en place pour vivre dans un tel environnement. Ainsi, l'utilisation d'un milieu riche tel que le milieu Marine Broth a pu influencer sur son métabolisme et sur son mode de vie, lui faisant perdre de façon irréversible ses propriétés électroactives.

Il n'est donc plus possible de construire en laboratoire des biocathodes formées à partir de biofilms monoespèces d'*Algoriphagus yeomjeoni*. Ces biocathodes auraient sans doute été de précieux modèles pour aller creuser les mécanismes fondamentaux d'échanges d'électrons entre l'électrode et les bactéries cathodiques mais aussi pour éclaircir les phénomènes qui limitent la colonisation des électrodes. Par conséquent, la démarche expérimentale ayant permis l'isolation d'*Algoriphagus yeomjeoni* va être réitérée avec l'objectif de tenter à nouveau la sélection d'un ou plusieurs isolats électroactifs. La première étape est de former un biofilm marin aérobique. Pour ceci, la collaboration avec le CNR ISMAR de Gênes a été réactivée. La formation de ce biofilm marin aérobique ainsi que la démarche pour la sélection de nouveaux isolats électroactifs sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre IV

Recherche de nouveaux isolats bactériens marins électroactifs

IV.1) Formation d'un nouveau biofilm marin aérobique dit « sauvage » et présentation de la démarche expérimentale envisagée pour isoler de nouvelles souches modèles

Le constat est clair. à $t_0 + 1$ année du démarrage de la thèse, la version de la souche modèle d'*Algoriphagus yeomjeoni* dont nous disposons au laboratoire n'est plus capable d'exprimer son caractère électroactif. Les raisons pouvant expliquer cette perte d'électroactivité restent floues. Nous supposons qu'il existe cependant un lien étroit entre la méthode que nous avons utilisée pour entretenir la souche (croissance sur un milieu riche Marine Broth) et le fait qu'elle ne puisse plus utiliser une électrode d'acier inoxydable comme donneur d'électrons lorsqu'elle est placée dans un milieu « métaboliquement plus restrictif » comme l'eau de mer. Ainsi, il semblerait donc que la succession des générations d'*Algoriphagus yeomjeoni* sur un milieu riche, favorisant un métabolisme classique de type hétérotrophe, entraîne une perte irréversible de l'expression des mécanismes impliqués dans le transfert d'électrons issus de donneurs d'électrons solides (type électrodes).

Une large partie des travaux de cette thèse reposait alors sur l'utilisation de la souche modèle *Algoriphagus yeomjeoni*. Pour continuer sur cette voie d'exploration, basée sur l'étude fondamentale de biofilms monoespèces, nous avons décidé de repartir d'un biofilm « sauvage » multiespèce et de tenter d'isoler à nouveau des souches pures capables de catalyser la réduction du dioxygène sur acier inoxydable.

Les biofilms marins aérobiques « sauvages » nous sont fournis par nos collègues Italiens du CNR ISMAR de Gênes. Les biofilms se forment naturellement sur une électrode d'acier inoxydable polarisée à un potentiel de $-0,2\text{V/Ag-AgCl}$ et exposée à de l'eau de mer continuellement renouvelée dans un bassin de leur station marine. La formation du biofilm électroactif aérobique sur la surface de l'électrode (colonisation) est suivie en relevant quotidiennement le courant électrique échangé sur l'électrode. En général, après un temps de latence de 3 à 10 jours suivant la température de l'eau, la colonisation de l'électrode se traduit d'abord par une montée exponentielle du courant électrique mesuré à la surface de l'électrode puis par une phase stationnaire à partir de laquelle on considère que l'électrode est colonisée.

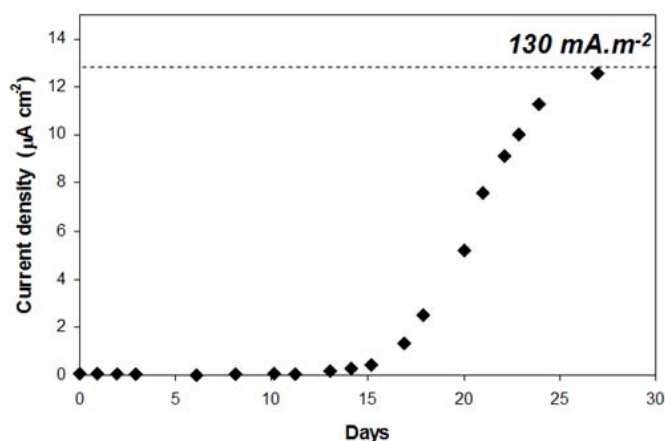


Figure IV-59 : Evolution de la densité de courant (valeur absolue), correspondant à la réduction de l'oxygène, sur une électrode en acier inoxydable polarisée à $-0,2\text{ V/Ag-AgCl}$ et exposée dans un système alimentée continuellement en eau de mer extrait de (Faimali et al., 2010).

Dans l'exemple présenté sur la [Figure IV-59](#), correspondant à un biofilm sauvage formé en hiver, la densité maximale de courant observé est de 130 mA.m^{-2} . Cependant, en été par exemple, lorsque les conditions environnementales sont plus favorables à la croissance des microorganismes, les densités de courant maximales sont de l'ordre de 300 à 500 mA.m^{-2} .

Les électrodes colonisées par des biofilms marins électroactifs « sauvages » nous sont fournies par lot de 6 électrodes colonisées afin de disposer d'une quantité de matière biologique (biofilm) suffisante pour travailler. Une de ces électrodes est systématiquement marquée à l'acridine orange (fluorochrome) puis observée en microscopie à épifluorescence d'une part pour vérifier si l'électrode est bien colonisée par un biofilm et d'autre part pour évaluer la quantité de biofilm disponible et sa répartition sur la surface de l'électrode. Les biofilms présents sur les autres électrodes sont collectés par grattage mécanique puis mis en suspension dans de l'eau de mer stérile. Cette suspension microbienne, est ensuite caractérisée, d'un point de vue microbiologique, par diverses techniques afin de différencier (i) la flore totale du biofilm sauvage, (ii) la flore hétérotrophe cultivable et enfin (iii) la flore hétérotrophe cultivable électroactive. Une vue d'ensemble de la démarche expérimentale utilisée est présentée sur la [Figure IV-60](#) :

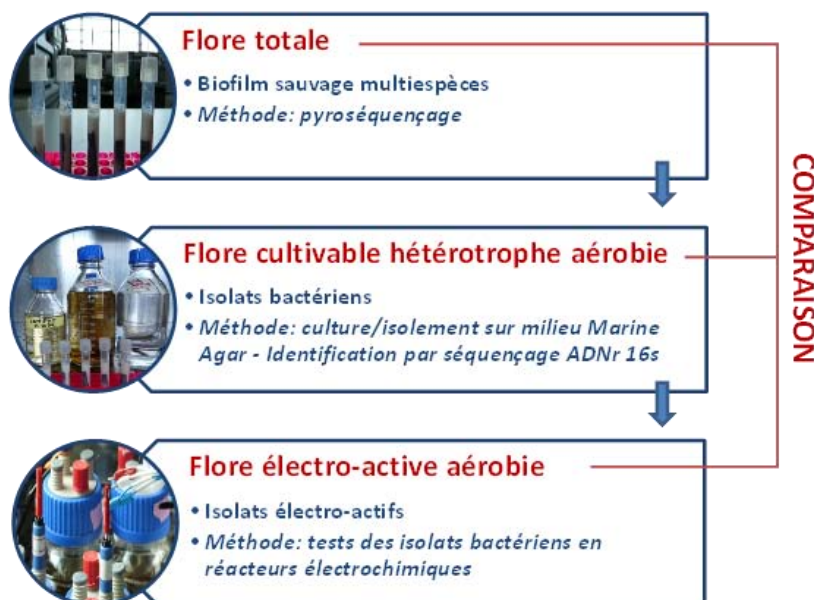


Figure IV-60 : Représentation schématique de la démarche conduisant à l'isolement de souches modèles capables de catalyser la réduction de l'oxygène et à l'analyse de la diversité des populations bactériennes.

IV.2) Analyse de la diversité bactérienne d'un biofilm cathodique formé en eau de mer par pyroséquençage

La suspension microbienne réalisée à partir du biofilm aérobie sauvage a subi une extraction génomique. La quantité d'ADNr 16S extraite était tellement faible (quantité de biofilm initial insuffisante) qu'elle n'était même pas détectable par spectrophotométrie à 260 nm . Le pool d'ADNr 16S a donc été amplifié par PCR, comme décrit dans la partie Matériel et méthodes, jusqu'à obtenir une concentration supérieure à 20 ng.mL^{-1} , c'est-à-dire une concentration suffisante autorisant une analyse par pyroséquençage. Le pyroséquençage est sous-traité chez un laboratoire américain (Research and Testing Laboratory, <http://www.researchandtesting.com>), utilisant la technologie 454. Les résultats du

pyroséquençage nous ont été renvoyés sous la forme d'une représentation phylogénétique contenant le pourcentage d'abondance de chaque phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce bactérienne (Annexe 7).

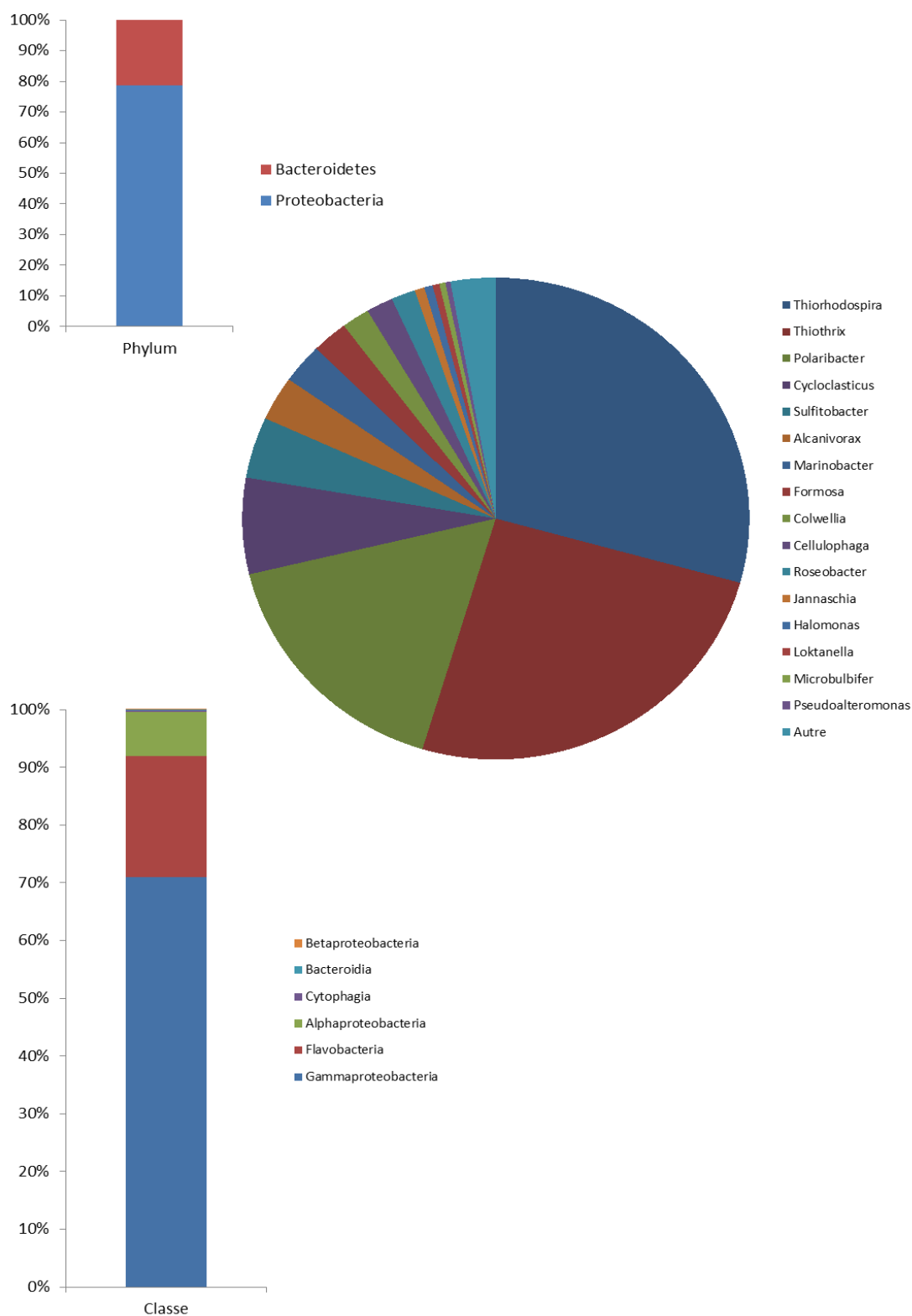


Figure IV-61 : Histogrammes représentant les proportions des phylums, classes et genres du biofilm marin aérobie. (% au sein du biofilm « sauvage »)

A partir de ces données brutes des diagrammes des différents niveaux phylogénétiques: phylum, classe et genre bactérien ont été réalisés afin de mieux visualiser l'abondance des divers acteurs au sein des biofilms « sauvages » (Figure IV-61). Pour des raisons de commodité dans l'interprétation des résultats et pour simplifier la discussion nous avons considéré que l'amplification par PCR n'a entraîné qu'un biais négligeable de la réalité. Certains auteurs ont déjà rapporté et discuté des biais que peuvent entraîner les étapes d'amplification par PCR lorsqu'elles sont surdimensionnées (Suzuki & Giovannoni, 1996). L'amplification, en ce qui nous concerne, a été réalisée pour atteindre le seuil limite techniquement nécessaire pour réaliser une analyse par pyroséquençage.

L'analyse du pyroséquençage du biofilm marin aérobic initial a révélé la présence de seulement deux phyla : Proteobacteria (79 %) et Bacteroidetes (21 %) (Annexe 7 et Figure IV-61). A l'intérieur du phylum Proteobacteria, la classe des Alpha- et surtout celle des Gammaproteobacteria étaient dominantes avec respectivement 7,5 et 71 %. Ce qui n'est pas étonnant puisque les deux classes dominantes (en proportion de séquences ribosomiques) en milieu marin sont les Alphaproteobacteria et les Gammaproteobacteria (Biers et al., 2009; Zinger et al., 2011). Concernant le phylum des Bacteroidetes, il comprend 3 familles : Bacteroidaceae, Cytophagaceae et Flavobacteriaceae. Cette dernière était vraiment dominante : presque 20 %. La classe Flavobacteria est très représentée en environnement marin surtout dans les eaux de surface (Ravenschlag et al., 2001).

Des informations sur la composition microbienne de biofilms similaires formés en eau de mer et réduisant le dioxygène ont déjà été données (Vandecandelaere et al., 2010), mais seulement à travers la fraction cultivable des biofilms. De façon assez surprenante, une forte diversité phylogénétique avait été révélée. Les microorganismes identifiés appartenaient aux phyla des Proteobacteria (Alpha- et Gammaproteobacteria), Firmicutes, Actinobacteria et Bacteroidetes (comprenant uniquement des membres de la famille des Flavobacteriaceae) (Vandecandelaere et al., 2010). La même année, une autre étude ayant également pour but d'identifier les microorganismes présents sur des biocathodes en acier inoxydable en milieu marin a été réalisée (Erable et al., 2010) mais cette fois-ci sur l'ensemble de la population du biofilm et non pas uniquement sur la fraction cultivable. L'identification par séquençage de l'ADNr 16S a révélé des résultats très similaires à l'étude de Vandecandelaere et al., 2010. La méthode utilisée a mis en évidence des espèces bactériennes provenant des classes Alpha- et Gammaproteobacteria, de Firmicutes, d'Actinobacteria et de Flavobacteriaceae provenant du biofilm.

Dans notre étude, la diversité phylogénétique est moindre que celle obtenue lors des travaux de Vandecandelaere. L'absence de Firmicutes dans les résultats du pyroséquençage est assez surprenante car, comme nous le verrons plus tard dans le manuscrit, une espèce bactérienne du genre *Bacillus* (phylum des Firmicutes) a été isolée sur milieu solide (flore cultivable du biofilm sauvage). Ces différences significatives sont clairement liées aux méthodes utilisées pour l'analyse des populations. En effet, dans les méthodes d'analyse par des approches moléculaires, des biais sont souvent induits lors de l'étape d'extraction et/ou d'amplification des acides nucléiques. Dans notre cas précis, une étape intermédiaire de PCR a été nécessaire avant la réalisation du pyroséquençage en raison des faibles concentrations d'ADNr 16S qui ont été extraites du biofilm marin. Cette étape intermédiaire a pu masquer la présence initiale d'espèces bactériennes minoritaires. Néanmoins, la présence de Proteobacteria et de Bacteroidetes comme phyla dominants et la présence majoritaire de Gammaproteobacteria ont été toutes deux confirmées ici. La littérature rapporte également que des Proteobacteria et Bacteroidetes ont été détectés dans les communautés microbiennes d'un biofilm obtenu à

partir d'un mélange d'eau douce et de sédiments fluviaux et capable de catalyser la réduction du dioxygène sur des matériaux d'électrode carbonés (Rabaey et al., 2008).

En comparant maintenant la diversité bactérienne au sein de ces biofilms aérobies électroactifs formés en milieu marin avec d'autres types de biofilms marins non électroactifs, il semblerait que l'on retrouve le même type de phyla au sein des deux types de biofilms. Par exemple, une étude sur la diversité microbienne des biofilms de la Grande barrière de corail en Australie, réalisée par DGGE (denaturent gradient gel electrophoresis), présente la présence des mêmes phyla et classes (Alpha- et Gammaproteobacteria et Bacteroidetes) que nous avons mis en évidence au sein des biofilms électroactifs par pyroséquençage (Kriwy & Uthicke, 2011). Souvent également, cette diversité microbienne décrite au sein des biofilms marins est la même que la diversité microbienne retrouvée au sein des communautés planctoniques dans l'eau de mer (Kriwy & Uthicke, 2011).

IV.3) Isolement des nouvelles souches marines et identification

Les bactéries marines, comme la plupart des microorganismes, se développent préférentiellement sur des surfaces (Zobell, 1943). Ainsi, lorsqu'une électrode est immergée en milieu marin celle-ci va être colonisée par diverses souches bactériennes, en association avec d'autres types de microorganismes, qui vont s'organiser pour former un biofilm. La présence d'une concentration accrue en matière organique, comme c'est le cas dans le port de Gênes (localisation côtière proche de l'activité humaine), favorise un enrichissement du biofilm en espèces bactériennes au métabolisme organotrophe (donneurs d'électrons et sources de carbone organiques) (Heip et al., 1995). Nous avons donc décidé de nous focaliser sur l'isolement des espèces organotrophes puisqu'il semblerait qu'elles soient majoritaires au sein du biofilm. La culture des bactéries de ce type trophique est également la plus simple à mettre en œuvre et les cinétiques de croissances de ces microorganismes en laboratoire sont relativement rapides.

IV.3.1) Isolement des souches sur milieux gélosés

Le protocole détaillé de la procédure d'isolement est présenté dans la section II.2.3.c). Les isolements ont été réalisés sur milieu Marine Agar ainsi que sur des géloses d'eau de mer synthétique (avec 15 % d'agar-agar) contenant 1 g.L⁻¹ de l'un des substrats organiques suivant: glucose, fructose, glutamate, lactate, pyruvate, acétate, citrate et malate. Ne connaissant pas précisément les substrats organiques utilisés par les microorganismes marins, diverses sources de matière organique (sucres ou acides organiques à courtes chaînes) ont été choisies pour que certaines espèces bactériennes puissent oxyder au moins un de ces composés organiques.

Quatre colonies d'aspect visuel différent ont été observées sur les différentes boîtes de Pétri contenant les différents milieux solides (Figure IV-62). Ces quatre colonies ont été prélevées puis isolées individuellement sur des boîtes de milieu Marine Agar.

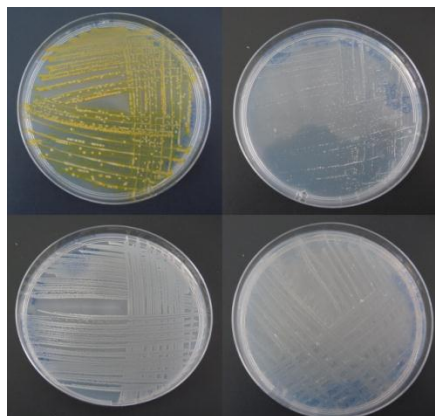


Figure IV-62 : Quatre souches isolées à partir du biofilm marin aérobie.

L'identification des bactéries correspondant à ces colonies s'est faite par séquençage de l'ADNr 16S par la méthode de Sanger qui implique une extraction génomique préalable suivant le protocole présenté en II.2.3.b et d). Une lecture spectrophotométrique à 260nm a permis de déterminer la quantité d'ADN génomique extraite, en considérant qu'une unité de DO_{260nm} correspond à une concentration d'ADN de $50 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Cependant, les quantités d'ADN génomique extraites n'étaient pas suffisantes pour réaliser un séquençage direct, le seuil requis étant de $20 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ avec un volume minimal de $20 \mu\text{L}$. Une amplification de l'ADNr 16S a donc été nécessaire et a été réalisée comme décrit en II.2.2.c). Le séquençage des ADNr 16S a été pris en charge par le Dr Mathieu Bergé de la Faculté de Pharmacie de Toulouse et quatre séquences ont été obtenues et comparées à une banque de séquences par BLAST sur le site NCBI. En raison du pourcentage d'homologie des séquences d'ADNr 16S assez faible, l'identification n'a pu être obtenue qu'au stade du genre bactérien et non jusqu'à l'espèce. Les quatre isolats correspondent alors au genre *Bacillus*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas* et *Roseobacter*.

Marinobacter :

```
CGCACTCAGTGTCAGTATTGGTCCAGAGTGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTTCCTATATCTACGCATTTACCC
GCTACACAGGAAATTCCACACTCCTCTACCATACTCTAGCCTGACAGTTTCGAAATGCCGTTCCCAAGGTTGAGCCC
GGGGCTTTTCACATCTCGCTTATCAAACACCTACGCGCGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCC
TCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTGAGTAACGTCAAGCCTCACGAGTATT
AATCTTAAGGTTTTCTCTCTCACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAAGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGA
TCAGGGTTGCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGGCCGTGTCTCAGTCCCGAT
GTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGTTAGGCTCTTACCCCACTAGCTAATCCG
ACATAGGCACATCCAATAGCGCAAGGTCCGAAGATCCCCTGCTTTCCCCGAAGGGCGTATGCGGTATTAATCCG
GGTTTCCCCGGGCTATCCCCACTACTGGGCAGTTTCTATGCACTTACTACCCGTCGCCCGCTCGTCAGCGGGG
AGCAAGCTCCCCCTGTTACCGCTCGACTTGCAATGTGTTAAGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGA
```

Bacillus :

```
CTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG
GGTAACCTACCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTGAACTGCATAGT
TCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAG
GCTTTCGGGTCTGTAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCAATTGGA
AAGTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGA
ACACAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GTA
```

Pseudoalteromonas :

TAGCTTGCTACTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAAACATGCCTTGAGGTGGGGGACAACA
GTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCC
AAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGC
CTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGAGGAAAGGTTAGT
AGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAG
CCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGGAAGTGGCAAACTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCATGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTGGGTCAACACTGACTCTCAT
GTACGAGAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATAG

Roseobacter :

CTACACATGCAGTCGAGCGCACCCCTTCGGGGCGAGCGGCGGACGGGTAGTAACGCGTGGGAAACATACCTTTCAC
TACGGAATAGCCTCGGGAACTGAGAGTAATACCGTATACGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGTGAAAGATTG
GCCCCGTAAGATTAGATAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGTCTACGATCTTTAGCTGGTTTTAGAGGATGA
TCAGCAACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTAGACAATGGGCGC
AAGCCTGATCTAGCCATGCCGCGTGTGTGATGAAGGCCTTAGGGTCGTAAAGCACTTTCGCTAGGGATGATAATG
ACAGTACCTAGTAAAGAAACCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGTTAGCGTTGTTT
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGTACGTAGGCGGATCAGAAAGTAGGGGGTGAATCCCGAGGCTCAACCTCGGAAC
TGCCTCCTAACTCCTGGTCTTGAGTTTCGAGAGAGGTGAGTGAATTCAGGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATA
TTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTACGAAAGTGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGTAG

Ces différents isolats sont tous cultivables sur le milieu « riche » Marine Agar. Sur un milieu synthétique minium comme l'eau de mer supplémentée en minéraux et en vitamines, la croissance des isolats est dépendante de la nature des substrats organiques qui leur sont fournis (Tableau IV-15).

Tableau IV-15 : Croissance des 4 souches isolées à partir des biofilms complexes en fonction des milieux de culture et de la nature des substrats organiques.

		<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Roseobacter</i>	<i>Marinobacter</i>
Eau de mer synthétique + vitamines + micronutriments	Glucose	+	+	+	+
	Fructose	+	-	-	+
	Glutamate	+	-	+	+
	Lactate	+	-	+	-
	Pyruvate	+	-	+	-
	Acétate	+	-	+	-
	Citrate	-	+		-
	Malate	-	-	-	-
Marine Agar		+	+	+	+

IV.3.2) Positionnement des isolats bactériens par rapport à la diversité microbienne du biofilm marin « sauvage »

Trois des quatre genres isolés par une approche microbiologique, c'est-à-dire par une méthode de culture sur milieu gélosé, font partie des 16 genres les plus représentés parmi les 55 genres présents dans le biofilm marin initial (Figure IV-61). Quantitativement, *Marinobacter* arrive en 7ème position avec une représentation à hauteur de 2,7 % des communautés totales du biofilm. Ce genre a été décrit en milieu marin en 1992 avec la découverte de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Gauthier et al., 1992). *Marinobacter* regroupe des bacilles à coloration de Gram négative, aérobies et hétérotrophes. Sa présence en milieu marin a souvent été observée du côté de l'Asie du Sud Est (Sun et al., 2008).

En 11ème position vient le genre *Roseobacter* avec environ 1,5 % de la biomasse bactérienne du biofilm. Les *Roseobacter* sont des bacilles à coloration de Gram négative, mobiles, dont la croissance est hétérotrophe en condition aérobie. Les bactéries appartenant à ce genre présentent également une activité phototrophique aérobie. La couleur rose de leurs colonies est due à la présence d'un caroténoïde, la sphéroidenone. Les ions Na⁺, la biotine, la thiamine et l'acide nicotinique sont indispensables à sa croissance et sont présents dans la solution de vitamines ajoutée à l'eau de mer synthétique. Le pH optimum et la température optimale de croissance pour ces microorganismes sont respectivement d'environ 7 et comprise entre 20 et 30°C (Shiba, 1991). Dans des études précédentes il a été montré que le genre *Roseobacter* peut représenter à lui seul plus de 25 % du bactérioplancton marin (Gonzalez & Moran, 1997; Suzuki et al., 2001; Pernthaler & Amann, 2005).

Le genre *Pseudoalteromonas*, lui occupe la 16ème position avec environ 0,3 %. Ce genre comprend des bacilles à coloration de Gram négative, strictement aérobies, chimio hétérotrophes avec un métabolisme respiratoire et non fermentaire (Gauthier et al., 1995). Plusieurs travaux portant sur la diversité microbienne en milieu marin ont décrit la présence de *Pseudoalteromonas* (Du et al., 2006; Egan et al., 2008; Wilson et al., 2010).

Bien que le genre *Bacillus* ait été isolé à partir du même biofilm marin, les résultats du pyroséquençage n'ont pas du tout révélé la présence de ce genre bactérien. Ce constat suggère que la présence initiale de *Bacillus* est largement minoritaire dans le biofilm marin « sauvage ». L'amplification du matériel génétique préalablement effectuée au pyroséquençage a certainement accentué les écarts de représentation relatifs entre les populations dominantes et les minoritaires. Pour expliquer la présence de cette espèce de *Bacillus* sur les boîtes de Pétri, il se peut que certains membres de ce genre bactérien soient très résistants et qu'ils aient survécus plus longtemps que la majorité des autres bactéries initialement présentes dans le biofilm.

Peu de publications sont consacrées à l'étude des espèces de *Bacillus* isolées en environnement marin. Pourtant, le genre *Bacillus* fait partie des genres dominants identifiés parmi les bactéries cultivables isolées à partir d'échantillons provenant également de milieu marin (Langumier et al., 2011). Une autre étude portant sur les bacilles marins a montré que les souches de *B. marinus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. cereus* et *B. mycoides* sont des habitants communs de l'océan Pacifique (Ivanova et al., 1999). Autre fait intéressant, les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont des bactéries à coloration de Gram positive, contrairement aux trois autres qui sont des bactéries Gram (-).

Deux souches, celles du genre *Pseudoalteromonas* et *Marinobacter*, parmi les quatre isolées sont membres de la classe dominante des Gammaproteobacteria. Ces deux souches sont par conséquent des éléments représentatifs des biofilms multiespèces naturels et pourraient être a priori de bons candidats pour aller plus loin dans l'étude fondamentale des mécanismes de transfert d'électrons.

IV.4) Tests électrochimiques avec les isolats bactériens

En considérant les résultats obtenus avec *Algoriphagus yeomjeoni* dans le chapitre III, le protocole pour les tests électrochimiques a été remis en question et a été finalement un peu réadapté.

Après avoir constaté la faible colonisation de la souche *Algoriphagus yeomjeoni* sur acier puisque l'eau de mer ne permet pas ou peu de croissance bactérienne, il nous a paru opportun de modifier le protocole pour favoriser l'adhésion des microorganismes sur la cathode en acier inoxydable 254SMO. Ainsi, les électrodes de travail en acier inoxydable ont été mises en contact avec des précultures bactériennes en phase stationnaire de croissance avant leur installation dans les réacteurs bioélectrochimiques.

La mise en place des réacteurs et leur suivi ont été présentés en partie II.2.3.e). Les différents essais présentés dans la suite de ce chapitre ont été réalisés chronologiquement, seuls le potentiel imposé et le milieu réactionnel sont variables d'un essai à l'autre. Chaque changement des conditions expérimentales est donc indiqué avant la présentation des résultats de chaque essai.

IV.4.1) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,2V/ECS

La filtration de l'eau de mer naturelle permet de s'assurer de la stérilité de celle-ci.

Les quatre souches sont testées individuellement, en parallèle d'un témoin non inoculé. Seule la souche *Roseobacter* présente une activité électrocatalytique (Figure IV-63).

En effet, les trois autres souches (*Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter*) n'ont montré aucune activité catalytique pendant les 15 jours de tests.

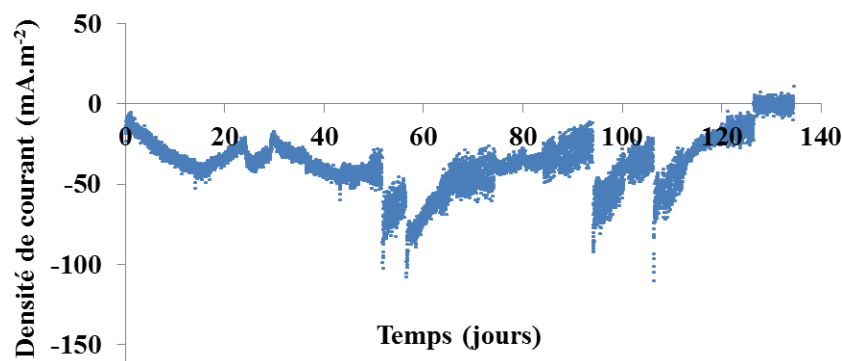


Figure IV-63 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,2 V/ECS, préalablement mise en contact avec une culture bactérienne de *Roseobacter* ; en eau de mer naturelle et sous une agitation de 300 rpm.

Plusieurs constats découlent de cette chronoampérométrie menée sur près de 140 jours (4 mois et ½). Tout d'abord, dès le démarrage de la chronoampérométrie, la densité de courant n'est pas nulle comme habituellement constaté mais avoisine déjà une densité de courant de -10 mA.m^{-2} . Ce courant non négligeable peut être adjugé à la mise en contact préalable de l'inoculum et de la cathode avant l'utilisation dans le réacteur bioélectrochimique. L'adhésion bactérienne doit bien être significative pour permettre l'obtention d'une densité de courant.

Le courant de réduction augmente progressivement et continuellement pour atteindre environ -50 mA.m^{-2} au 15^{ème} jour d'expérimentation pouvant certainement s'expliquer par la colonisation progressive de la cathode. Ce courant se maintient aux alentours de cette valeur jusqu'à $t > 100$ jours. Les augmentations de courant, parfois jusqu'à -100 mA.m^{-2} , correspondent systématiquement à la réalisation de voltammétries cycliques qui déstabilisent la surface de l'électrode. Chaque voltammétrie s'accompagne d'une période de relaxation pendant laquelle l'électrode de travail est laissée en circuit ouvert (potentiel d'abandon) pendant près d'une heure. Pendant cette période, la concentration en oxygène au sein du biofilm, et notamment au plus proche de l'électrode, a eu le temps d'évoluer pour se rapprocher de la solubilité maximale de l'oxygène dans le milieu réactionnel (expérience sous agitation). Dans le cas d'une vitesse de réaction limitée par le transport d' O_2 dans le biofilm, cette limitation est momentanément « levée » dans les instants qui suivent une voltammétrie.

La souche appartenant au genre *Roseobacter* a fourni une densité de courant jusqu'à plus de 120 jours, soit 4 mois. L'arrêt de la production de courant peut être dû à l'épuisement d'un composé du milieu réactionnel nécessaire soit au transfert électronique avec l'électrode soit à la croissance cellulaire des microorganismes. L'eau de mer naturelle est un milieu plutôt pauvre mais sa composition a été suffisante pour maintenir une production de courant pendant plus de 4 mois.

Le pH mesuré en début et en fin de manipulation reste inchangé c'est-à-dire un pH voisin de 8. Ceci n'avait pas été le cas au cours du test avec *Algoriphagus yeomjeoni* présenté en III.4.3). Lorsque le pH ne s'acidifie pas, la production de courant reste limitée en général, dans des expériences en batch, à -50 - 100 mA.m^{-2} (Erable et al., 2010). C'est certainement l'acidification du milieu qui a permis à *Algoriphagus yeomjeoni* de fournir des courants plus élevés (-900 mA.m^{-2}). D'autres essais ont été réalisés dans les mêmes conditions mais aucune production de courant n'a plus été observée.

IV.4.2) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,2 puis - 0,3V/ECS

Un nouvel essai dans les mêmes conditions que précédemment a été réalisé. Cependant, ne voyant pas apparaître de courant, le potentiel imposé à l'électrode a été changé au bout du 14^{ème} jour d'expérience (Figure IV-64). Jusqu'à présent les potentiels imposés sur acier inoxydable ont toujours été de $-0,2 \text{ V/ECS}$ pour les expériences concernant la catalyse de la réduction du dioxygène à la cathode en laboratoire et $-0,2 \text{ V/Ag-AgCl}$ ($-0,243 \text{ V/ECS}$) pour les expériences de terrain en mer, nous avons tenté d'imposer un potentiel encore plus cathodique soit $-0,3 \text{ V/ECS}$ au risque d'empiéter sur la catalyse surfacique abiotique de réduction du dioxygène spécifique à l'acier inoxydable. Nous pouvons rappeler ici qu'il y a un réacteur de contrôle (abiotique) en parallèle de chaque expérience. Ce contrôle permet de discriminer si les phénomènes constatés dans les expériences sont bien d'origine bactérienne.

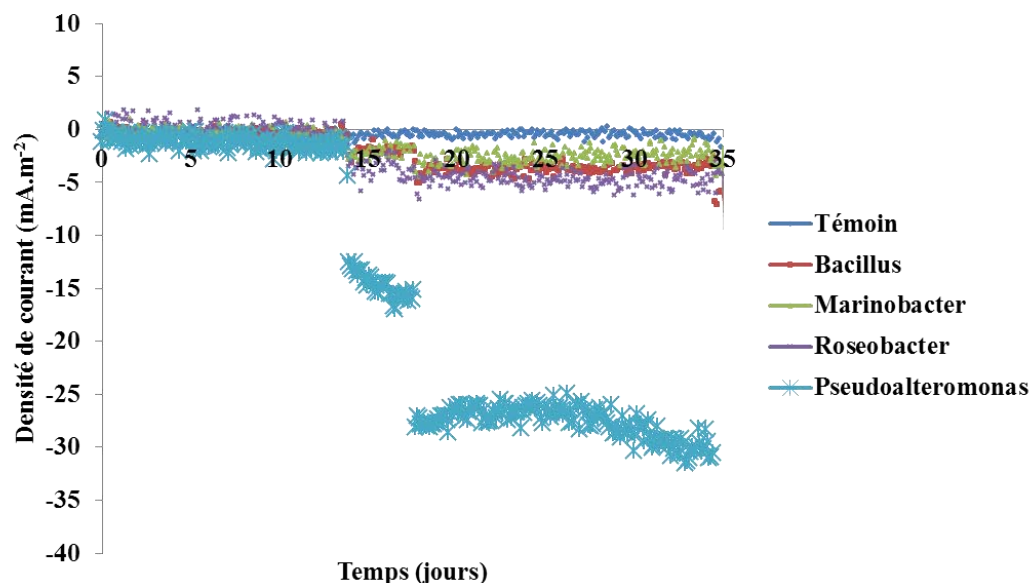


Figure IV-64 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,2 V/ECS puis à - 0,3 V/ECS au 14^{ème} jour d'expérimentation, préalablement mise en contact ou non (Témoin) avec une culture bactérienne de *Bacillus*, *Marinobacter*, *Roseobacter* ou *Pseudoalteromonas* ; en eau de mer naturelle et sous une agitation de 300 rpm.

Lors du changement de potentiel à - 0,3 V/ECS, les trois électrodes microbiennes mises en contact avec *Bacillus*, *Marinobacter* et *Roseobacter* ont vu instantanément leur densité de courant passer de 0 à environ - 5 mA.m⁻² (Figure IV-64). Ces densités de courant sont stables sur une vingtaine de jours. Le témoin, lui, ne montre toujours aucun courant démontrant ainsi que la catalyse de la réaction de réduction est bien due à la présence des cellules bactériennes. Concernant le test avec la souche de *Pseudoalteromonas*, le changement de potentiel s'est traduit par une augmentation de courant encore plus significative. En effet, un saut instantané à - 30 mA.m⁻² a été observé au 17^{ème} jour. Ce courant est resté constant jusqu'au 35^{ème} jour (Figure IV-64).

L'expérimentation s'est déroulée sur 55 jours. Du 35^{ème} au 55^{ème} jour, plusieurs tests ont été effectués dans l'objectif de démontrer que la réaction de réduction catalysée est bien la réduction du dioxygène en eau : $O_2 + 4 H^+ + 4 e^- \rightarrow 2 H_2O$.

L'agitation mécanique (barreau aimanté) est utilisée pour maximiser le transport de l'oxygène en solution. Lorsque l'agitation du milieu réactionnel a été arrêtée, les densités de courant des quatre souches ont diminué (Figure IV-65 A1 et A2). Et, lorsqu'elle a repris, les densités de courant ont retrouvé leurs valeurs initiales. Les densités de courant se sont stabilisées pour *Bacillus* et *Marinobacter*. Mais, dans le cas de *Roseobacter*, le courant devient nul au 42^{ème} jour juste après la reprise de l'agitation ce qui signifie que l'arrêt de l'agitation a eu un impact néfaste sur ce microorganisme. Dans le cas de *Pseudoalteromonas*, qui présente les meilleures performances, un barbotage d'air a été réalisé. Celui-ci provoque une augmentation du courant, la densité de courant maximale est alors de - 120 mA.m⁻² (Figure IV-65 B1 et B2).

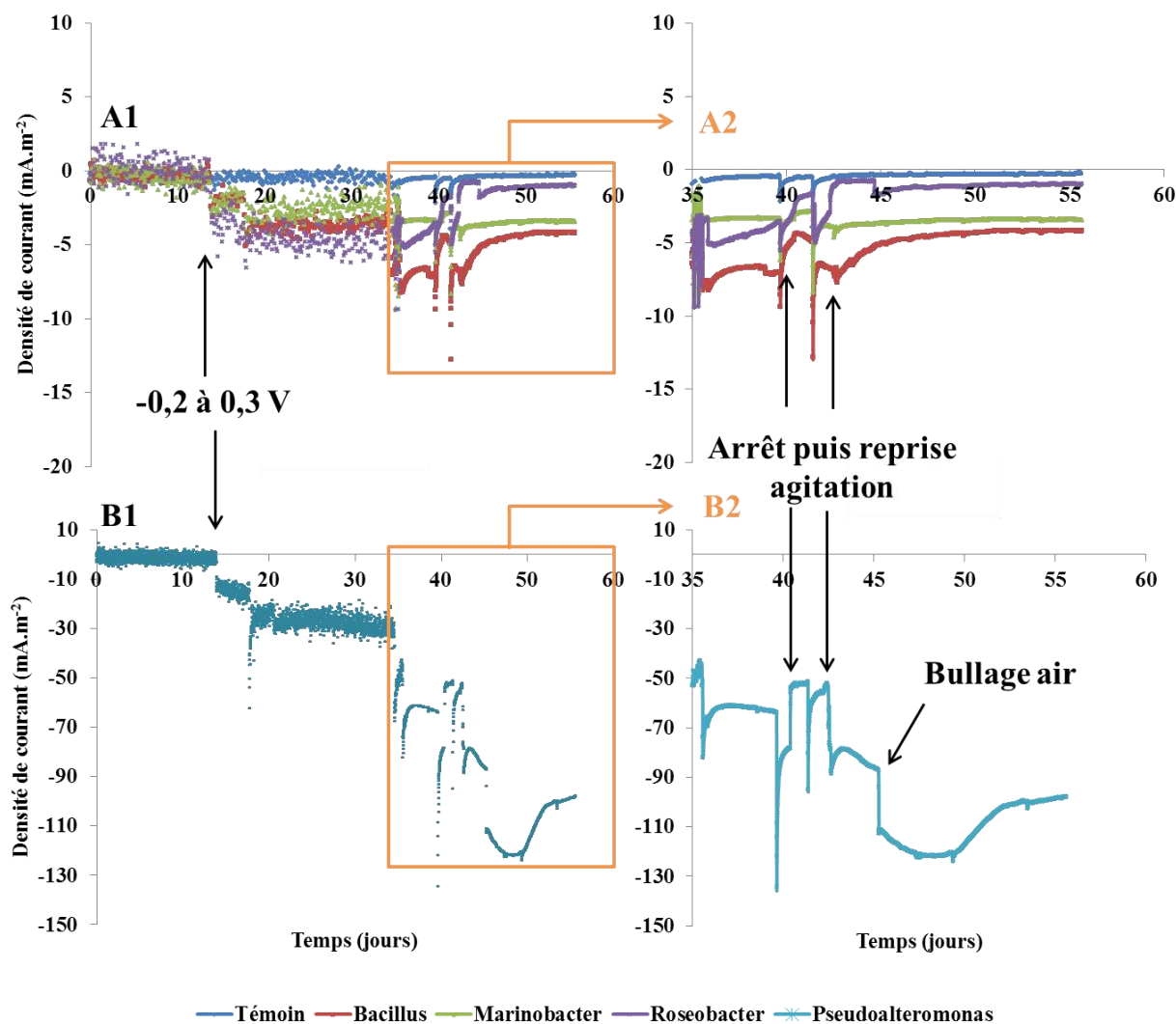


Figure IV-65: Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO, zoom sur l'effet de l'arrêt de l'agitation de 300 rpm et d'une injection d'air (uniquement pour le test concernant *Pseudoalteromonas*).

Cela pourrait s'expliquer par un bon transfert de masse provoqué également par le barbotage d'air en plus d'une plus forte concentration de dioxygène dans le milieu réactionnel. L'effet de l'agitation ainsi que celui du barbotage d'air peut également être observé en voltamétrie cyclique (Figure IV-66).

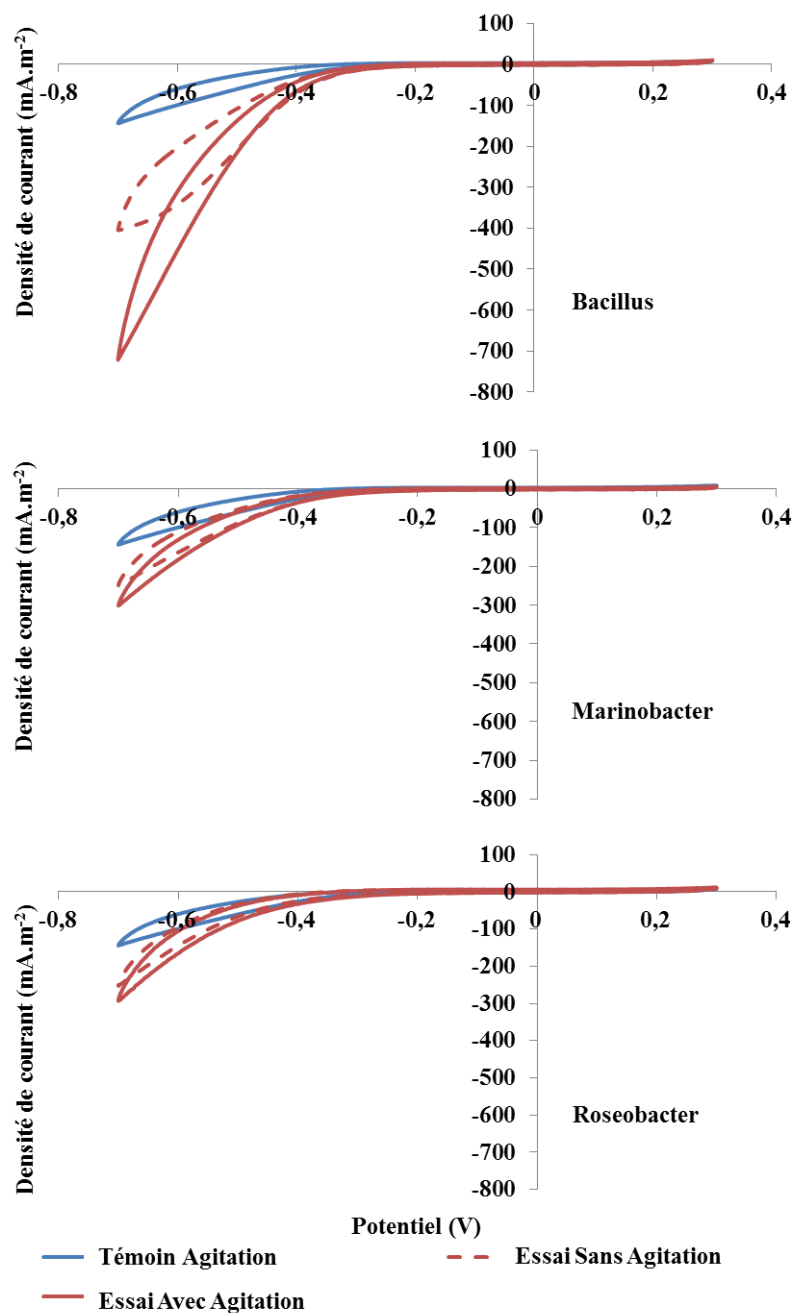


Figure IV-66 : Effet de l'agitation sur la catalyse de la réduction du dioxygène par *Bacillus*, *Marinobacter* et *Roseobacter* (en rouge linéaire : sans agitation ; en rouge pointillé : avec agitation) sur acier inoxydable comparé à un réacteur témoin (non inoculé) sous agitation (en bleu).

Tout d'abord, les résultats des voltammétries cycliques sont bien en cohérence avec ceux obtenus précédemment lors des chronoampérométries. En effet, lorsqu'on compare les densités de courant maximales obtenues à des vitesses de balayage lentes (donc très proche des conditions stationnaires) avec *Bacillus*, *Marinobacter* et *Roseobacter*, ce sont les biofilms de *Bacillus* qui présentent les intensités maximales les plus élevées, plus de 700 mA.m^{-2} sous une agitation de 300 rpm. Du fait des faibles performances en termes de densité de courant

obtenues avec les souches des genres *Marinobacter* et *Roseobacter*, il est plus difficile d'identifier une différence notable sur les voltammogrammes réalisés avec et sans agitation. Sous agitation, les densités de courant sont toujours plus importantes pour un même potentiel donné traduisant d'une plus forte catalyse de la réaction de réduction ainsi que d'un meilleur transfert d'électrons entre les microorganismes et l'électrode d'acier inoxydable. L'agitation apporte une hydrodynamique dans le milieu réactionnel favorisant le transfert de matières (et donc de dioxygène) en solution. Le phénomène de convection apporté dans le milieu diminue le gradient de pH installé dans le biofilm. Pour un biofilm fin (quelques μm d'épaisseur), la concentration en oxygène à l'interface biofilm/électrode se rapproche de la concentration saturante en oxygène en solution dans les conditions de l'expérience (c'est-à-dire la solubilité maximale).

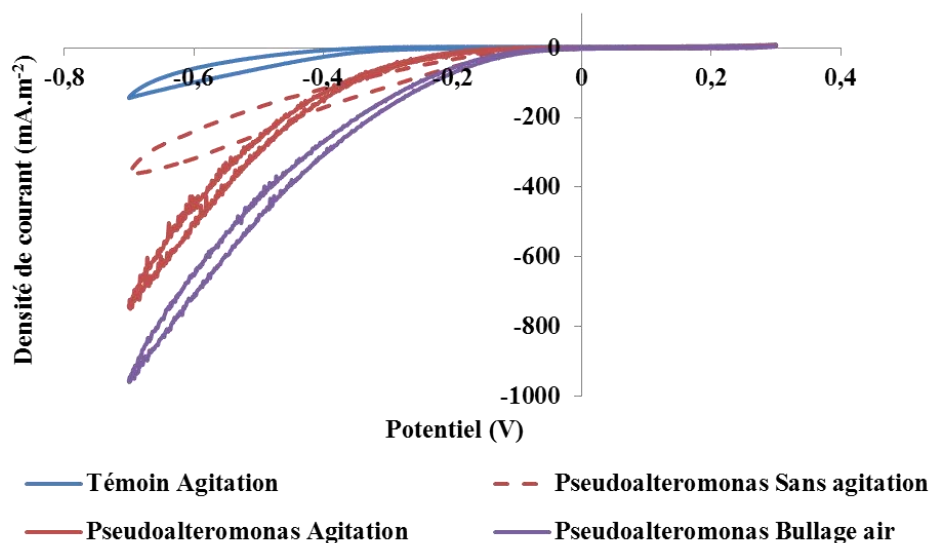


Figure IV-67: Effet de l'agitation (en rouge linéaire : sans agitation ; en rouge pointillé : avec agitation) et d'une injection d'air (en violet) sur la catalyse de la réduction du dioxygène par *Pseudoalteromonas* sur acier inoxydable comparé à un réacteur témoin (non inoculé) sous agitation (en bleu).

Des tests complémentaires sur l'optimisation de l'apport en oxygène (accepteur d'électrons) ont été réalisés sur le biofilm de *Pseudoalteromonas* qui avait donné en chronoampérométrie près de 120 mA.m^{-2} sous un bullage d'air. L'influence de l'apport d'air dans le milieu réactionnel par agitation du milieu ou bien par barbotage d'air a été comparée en réalisant des voltammétries cycliques dans des conditions identiques (Figure IV-67). La voltammétrie cyclique réalisée sous barbotage d'air montre un effet encore plus bénéfique sur l'apport de dioxygène (densité de courant plus élevée qu'avec l'agitation pour un même potentiel) et donc pour la catalyse de la réduction du dioxygène.

Du fait de ces résultats encourageants sur la formation des biofilms cathodiques monoespèces sous un potentiel imposé de $-0,3 \text{ V/ECS}$, les expériences ont été poursuivies en imposant dès le début et pour toute la durée des expériences un potentiel de $-0,3 \text{ V/ECS}$.

IV.4.3) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,3 V/ECS

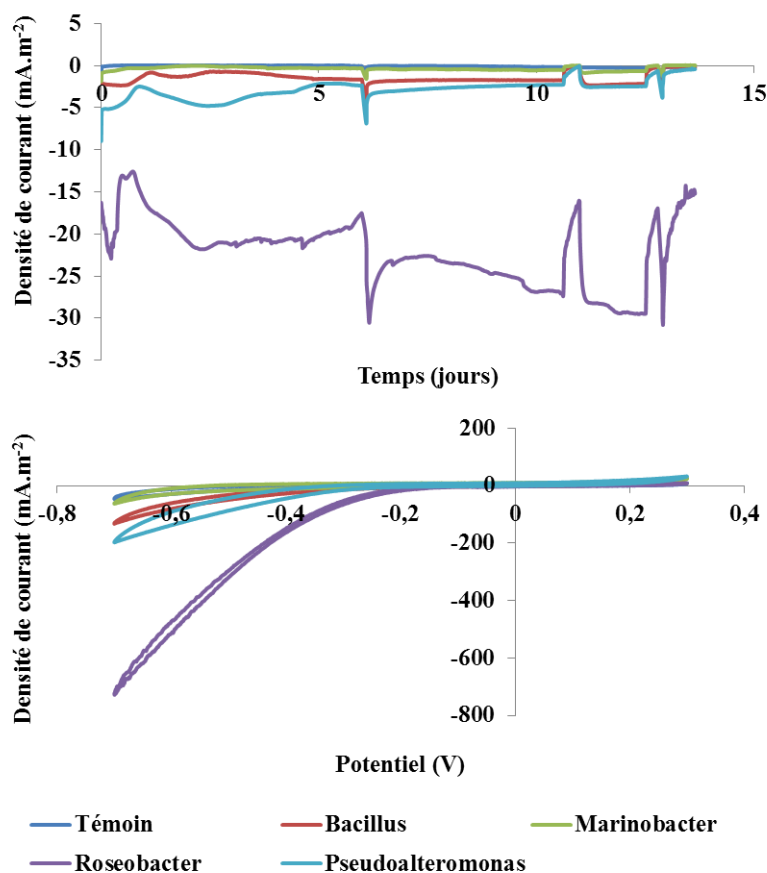


Figure IV-68 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,3 V/ECS, préalablement mise en contact ou non (Témoin) avec une culture bactérienne de *Bacillus*, *Marinobacter*, *Roseobacter* ou *Pseudoalteromonas* ; en eau de mer naturelle et sous une agitation de 300 rpm. Les voltammétries cycliques ont été réalisées simultanément au 6^{ème} jour d'expérimentation.

Pour la première fois, la mise en œuvre de tous les isolats a conduit à l'observation d'un courant cathodique. Le paramètre clef était bien le potentiel de polarisation. Lors de ce premier essai effectué directement à un potentiel d'électrode constant de - 0,3 V/ECS, seul le biofilm du genre *Roseobacter* se distingue des 3 autres biofilms avec une densité de courant d'environ -20 mA.m^{-2} dès le début de l'expérience alors que les autres atteignent péniblement entre -3 et -5 mA.m^{-2} (Figure IV-68).

Un fait marquant, à souligner, est que le courant cathodique est observé dès le démarrage de la chronoampérométrie (c'est-à-dire sans aucune phase de latence) dans tous les bioréacteurs qui ont été inoculés avec les isolats tandis qu'aucun courant n'a pu être mesuré dans l'expérience témoin qui ne contient que de l'eau de mer. La mesure d'un courant non nul dès les premières secondes de la chronoampérométrie s'explique sûrement par la mise en contact préalable entre l'inoculum et l'électrode. Les bactéries qui ont adhéré à l'électrode ont été capables d'accepter des électrons de l'électrode dès l'application du potentiel au démarrage de la chronoampérométrie.

Ensuite, dans le cas de *Roseobacter*, le courant a augmenté progressivement au cours du temps pour atteindre environ -30 mA.m^{-2} lors de l'arrêt de l'expérience au 14^{ème} jour.

Concernant les trois autres souches, leur production de courant cathodique est plus faible, inférieure à -5 mA.m^{-2} .

Les voltammétries cycliques effectuées sur les 4 souches permettent de confirmer la présence d'une activité catalytique sur les électrodes en acier inoxydable (Figure IV-68). Cet effet catalytique est relativement plus prononcé concernant *Roseobacter*, confirmant au passage les premières conclusions avancées grâce à l'interprétation des courbes de la chronoampérométrie.

IV.4.4) Tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée, potentiel imposé - 0,3 V/ECS

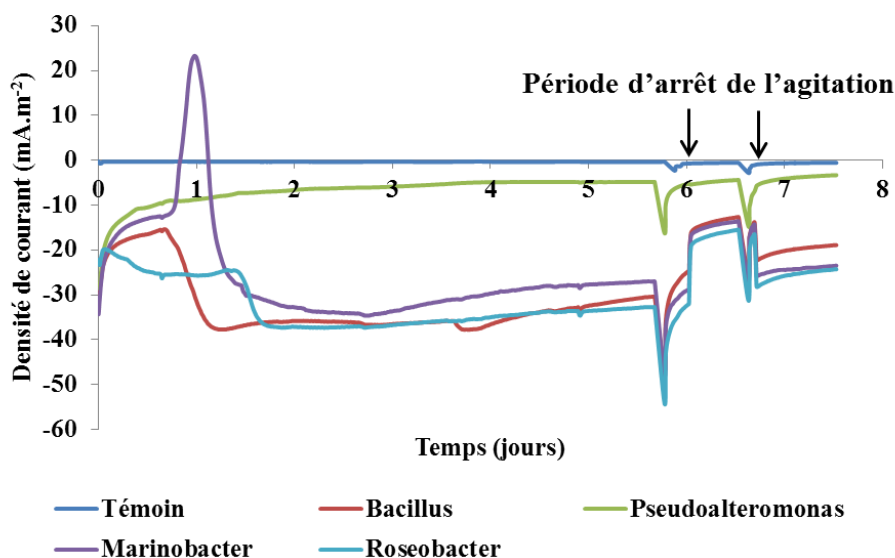


Figure IV-69 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,3 V/ECS, préalablement mise en contact ou non (Témoin) avec une culture bactérienne de *Bacillus*, *Marinobacter*, *Roseobacter* ou *Pseudoalteromonas* ; en eau de mer naturelle et sous une agitation de 300 rpm.

Jusqu'à maintenant, les différents tests réalisés avec les isolats sont assez peu reproductibles, voire même plutôt imprévisibles. En effet, il ne se dégage aucune « règle » ni « hiérarchie » entre les isolats. Tantôt l'un d'entre eux permet d'avoir les performances électrochimiques les plus importantes, tantôt, dans le test suivant, il aura des performances médiocres et c'est un des autres isolats qui, cette fois, aura des performances « boostées » par rapport aux autres.

Un second essai en eau de mer naturelle filtrée, à un potentiel imposé de -0,3V/ECS, a été relancé avec les quatre isolats et un témoin en parallèle. Cette fois-ci, trois souches sont parvenues à atteindre des performances électrochimiques entre - 30 et - 40 mA.m^{-2} (Figure IV-69). Par contre, le biofilm de *Pseudoalteromonas* n'a pas décollé au-delà de - 10 mA.m^{-2} , soit 3 à 4 fois moins que les autres souches. Mais surtout cette performance est douze fois inférieure à celle que cette souche avait pu atteindre lors de l'expérience précédente, soulignant le manque de maîtrise que nous avons sur la reproductibilité des résultats. Cette fois encore, l'importance de l'agitation a été constatée. En effet, l'arrêt de l'agitation effectué entre le 6^{ème} et le 7^{ème} jour s'est traduit systématiquement par une chute du courant cathodique.

Les expérimentations menées avec les isolats ont toutes été réalisées en eau de mer naturelle filtrée. A présent notre objectif serait de pouvoir réaliser le même type d'expériences dans un milieu bien défini et dont la composition est contrôlée comme l'eau de mer synthétique (supplémentée avec une solution de micronutriments et de vitamines). Ce type d'expériences en eau de mer synthétique reste un réel challenge car, malgré la supplémentation, l'eau de mer synthétique n'a pas la complexité de la composition de l'eau de mer naturelle et de ce fait un élément essentiel à la catalyse de la réduction du dioxygène pourrait facilement manquer. C'est d'ailleurs sur cette étape cruciale, du passage de l'eau de mer naturelle à l'eau de mer synthétique supplémentation, où nous avons eu des difficultés avec *Algoriphagus yeomjeoni*.

IV.4.5) Tests réalisés en eau de mer synthétique stérilisée par autoclavage, potentiel imposé - 0,3 V/ECS

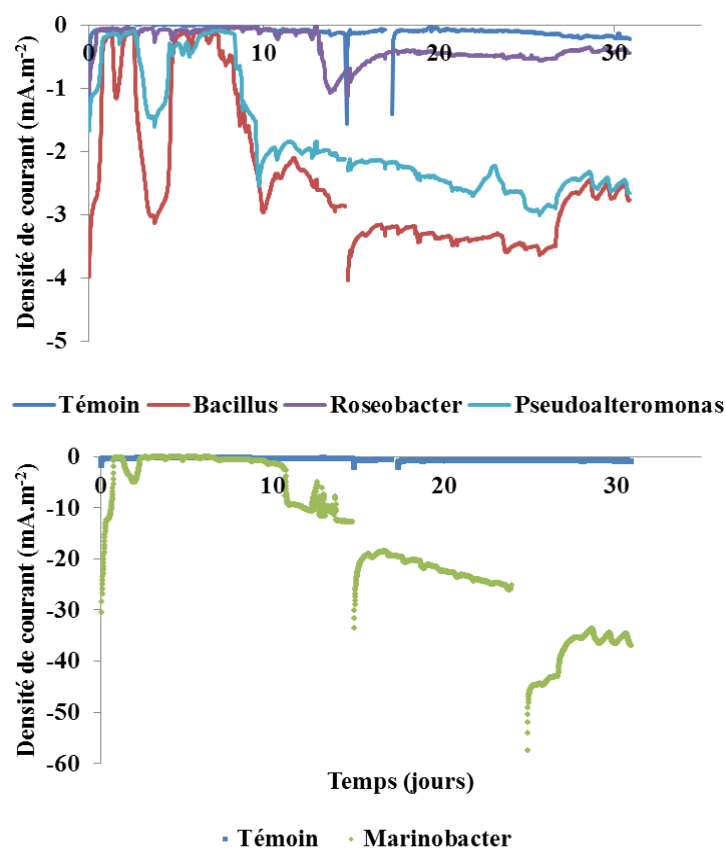


Figure IV-70 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à $-0,3$ V/ECS, préalablement mise en contact on non (Témoin) avec une culture bactérienne de *Bacillus*, *Marinobacter*, *Roseobacter* ou *Pseudoalteromonas* ; en eau de mer synthétique et sous une agitation de 300 rpm.

C'est la première fois que des biofilms monoespèces de bactéries marines aérobies sont capables de soutenir un courant de réduction en eau de mer synthétique. Plus précisément, l'électrode en acier inoxydable colonisée par l'isolat du genre *Marinobacter* a produit un maximum de courant d'environ -35 mA.m^{-2} en 1 mois (Figure IV-70). Pour les trois autres souches, les densités de courant qui apparaissent sont plus faibles. Ainsi, les densités de courant produites par les bactéries appartenant au genre *Bacillus* et *Pseudoalteromonas* plafonnent aux alentours de $-3/-4 \text{ mA.m}^{-2}$, et celles de *Roseobacter* n'atteignent pas les -1 mA.m^{-2} .

Une différence importante est à souligner entre les expérimentations en eau de mer naturelle et en eau de mer synthétique, celle-ci concerne le temps de latence avant l'apparition d'un signal de réduction. En effet, dans le milieu synthétique, contrairement à ce qui avait été observé en eau de mer naturelle, un temps de latence d'environ 10 jours a été observé en moyenne avant l'apparition du courant cathodique (sans tenir compte des artefacts certainement dû à un dépôt sur l'acier pour les essais avec *Bacillus* et *Pseudoalteromonas*). Pourtant le même mode opératoire de contact inoculum-électrode de 1 heure a été effectué avant le démarrage des réacteurs électrochimiques. Cette phase de latence peut amener l'hypothèse d'un mécanisme de réduction du dioxygène différent de celui qui est mis en place en eau de mer naturelle. Ou bien, tout simplement, est-ce la couche de cellules bactériennes adhérentes avant le test qui a besoin de plusieurs jours pour s'adapter « métaboliquement » au changement d'environnement lors du passage en milieu synthétique ? Ces questions restent ouvertes. La stabilité dans le temps de l'activité des biofilms en milieu synthétique est l'autre point très positif de ces tests. Après que le signal de réduction soit apparu, celui-ci a perduré pendant plusieurs dizaines de jours et était encore présent (et même croissant pour *Marinobacter*) lors de l'arrêt des expériences après 30 jours. L'eau de mer synthétique permet donc à nos quatre isolats d'exprimer leur électroactivité, à des niveaux d'activité différents, tout comme l'eau de mer naturelle, sur plusieurs semaines malgré des expériences menées en batch.

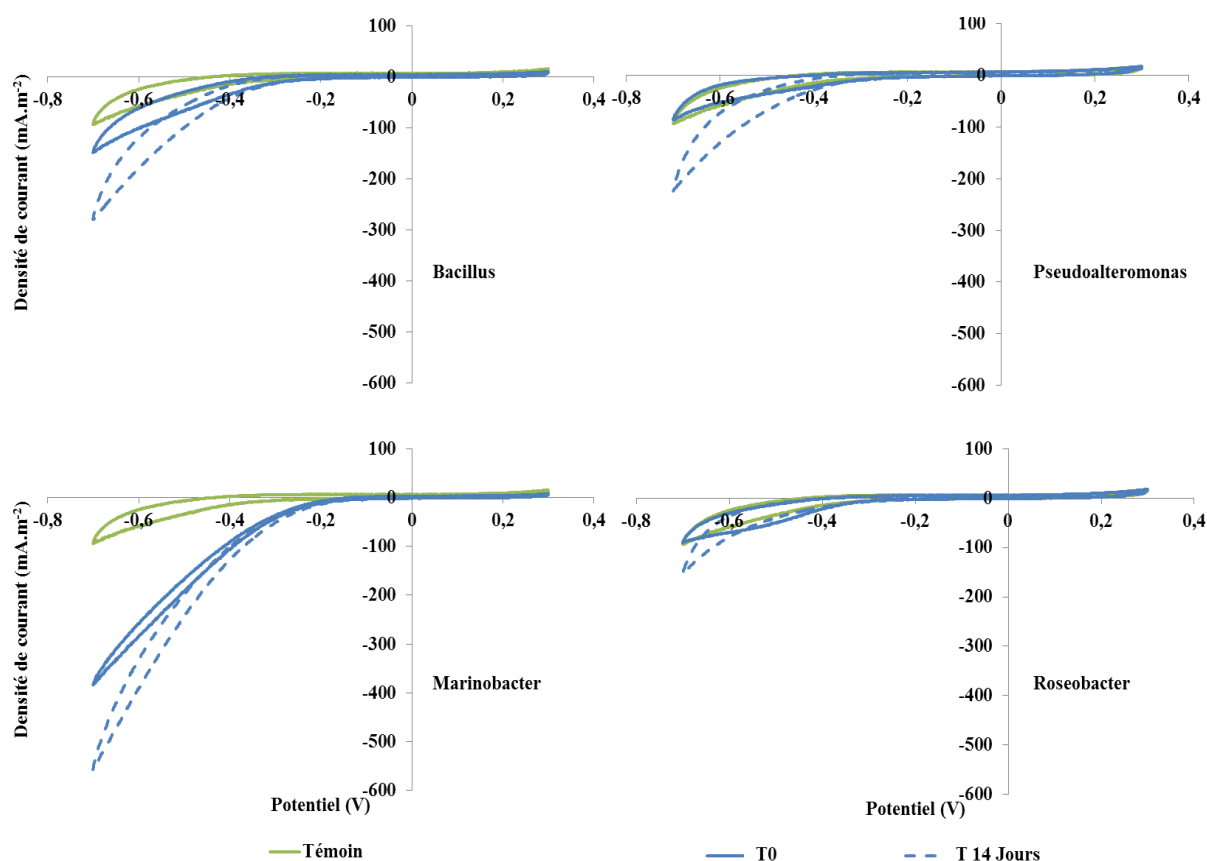


Figure IV-71 : Voltammogramme (- 0,7 à + 0,3 V/ECS) d'un biofilm de *Bacillus*, *Marinobacter*, *Roseobacter* et *Pseudoalteromonas* sur acier inoxydable 254SMO en eau de mer synthétique à T = 0 et 14 jours.

Pour toutes les souches, les profils de voltammétrie cyclique ont montré de meilleures performances au 14^{ème} jour qu'au démarrage de l'expérimentation ($t = 0$) attestant d'une phase de latence nécessaire avant la mise en avant des capacités électroactives plus ou moins efficaces des différents genres bactériens (Figure IV-71). Le voltammogramme concernant *Marinobacter* a mis également en avant une catalyse de la réduction du dioxygène plus efficace que pour les autres souches. La phase de latence observée indique potentiellement un mécanisme de réduction du dioxygène différent que celui observé en eau de mer naturelle. Ce changement de mécanisme se traduit par un temps plus ou moins long pour sa mise en place dans le réacteur bioélectrochimique.

Un second essai en eau de mer synthétique a été réalisé (duplicata de la campagne de tests précédente). Les résultats obtenus en chronoampérométrie ont été synthétisés avec les autres résultats des différents tests électrochimiques dans le Tableau IV-16 du paragraphe suivant.

IV.4.6) Bilan des tests électrochimiques réalisés avec les nouveaux isolats bactériens

Tableau IV-16 : Bilan des densités de courant obtenues lors des différents tests électrochimiques en eau de mer naturelle et synthétique et sous une agitation de 30 rpm.

	Eau de mer naturelle filtrée				Eau de mer synthétique	
	1 ^{er} essai mA.m ⁻²		2 ^{ème} essai mA.m ⁻²	3 ^{ème} essai mA.m ⁻²	1 ^{er} essai mA.m ⁻²	2 ^{ème} essai mA.m ⁻²
	-0.2V/réf	-0.3V/réf	-0.3V/réf	-0.3V/réf	-0.3V/réf	-0.3V/réf
Témoin	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudoalteromonas</i>	-2	-30	-5	-5	-3	-4
<i>Bacillus</i>	-0.5	-5	-5	-40	-3.5	-10
<i>Marinobacter</i>	-1	-4	-5	-40	-35	-8
<i>Roseobacter</i>	-1	-5	-30	-35	-0.5	-4

Le tableau de synthèse ci-dessus permet d'avoir une vue globale des résultats des différents essais réalisés à un potentiel d'électrode de - 0,2 ou - 0,3 V/ECS et en eau de mer naturelle ou synthétique. Ainsi, le changement du potentiel imposé à l'électrode en acier inoxydable, de - 0,2 V à - 0,3 V/ECS, en eau de mer naturelle filtrée, a clairement un effet positif sur les valeurs de densités de courant atteintes. Nous notons des rapports entre les densités de courant à - 0,2 et - 0,3 V/ECS entre 4 et 15 en fonction des isolats testés. Or, le point critique sur le manque de reproductibilité des résultats d'un test à l'autre ressort clairement du tableau. Globalement, le passage à la polarisation des électrodes à - 0,3 V/ECS en eau de mer naturelle filtrée a un impact différent selon les souches. En effet, *Pseudoalteromonas* présente des densités de courant assez faibles, environ - 5 mA.m⁻², alors que *Roseobacter* produit des densités de courant 6 à 7 fois plus élevées, environ - 30/35 mA.m⁻². Concernant *Bacillus* et *Marinobacter* il est impossible de trancher sur un effet positif ou négatif car les résultats entre les deux essais sont trop éloignés : - 5 et - 40 mA.m⁻². Même si l'écart entre les résultats des tests est souvent très (trop) éloigné, nous avons choisi de calculer la moyenne des densités de courant de toutes les expériences conduites en eau de mer naturelle et la comparer à celle des expériences en milieu de mer synthétique. Les moyennes des densités de courant sont respectivement de - 21,8 mA.m⁻² et - 8,5 mA.m⁻² pour l'eau de mer naturelle filtrée et pour l'eau de mer synthétique. Il y a donc plus de deux fois plus de courant en eau de mer naturelle

qu'en eau de mer synthétique. L'eau de mer synthétique, bien qu'elle ait l'avantage d'être parfaitement contrôlée, ne présente pas toutes les caractéristiques permettant aux bactéries d'exprimer le plus efficacement leur électroactivité.

Sur la globalité des tests électrochimiques, que cela soit en eau de mer synthétique ou naturelle, il y a toujours eu des isolats qui ont permis un meilleur fonctionnement de la cathode en acier inoxydable que d'autres mais malheureusement, ce ne fût jamais les mêmes. Ce phénomène reste inexplicable. Toutefois, l'obtention d'un courant cathodique par un biofilm marin monospèce en eau de mer synthétique est vraiment la première démonstration au niveau international. Autre point positif, cette performance reste stable au cours du temps puisque le signal de réduction a été maintenu pendant presque 1 mois dans un environnement fermé (batch). Du fait de ces nouveaux résultats encourageants, obtenus à - 0,3 V/ECS, avec les isolats bactériens, nous avons décidé de suivre le même protocole à - 0,3 V/ECS avec la souche *Algoriphagus yeomjeoni*. Durant le premier chapitre des résultats (chapitre III), nos efforts s'étaient concentrés sur la modification du milieu réactionnel (eau de mer synthétique) mais il nous semble maintenant plus réaliste que la clef de la solution soit dans le changement du potentiel associé à une phase de contact électrode-inoculum bactérien (pré-adhésion) avant le démarrage des réacteurs électrochimiques.

IV.4.7) *Algoriphagus yeomjeoni* : tests réalisés en eau de mer naturelle filtrée et synthétique stérilisée par autoclavage, potentiel imposé - 0,3 V/ECS

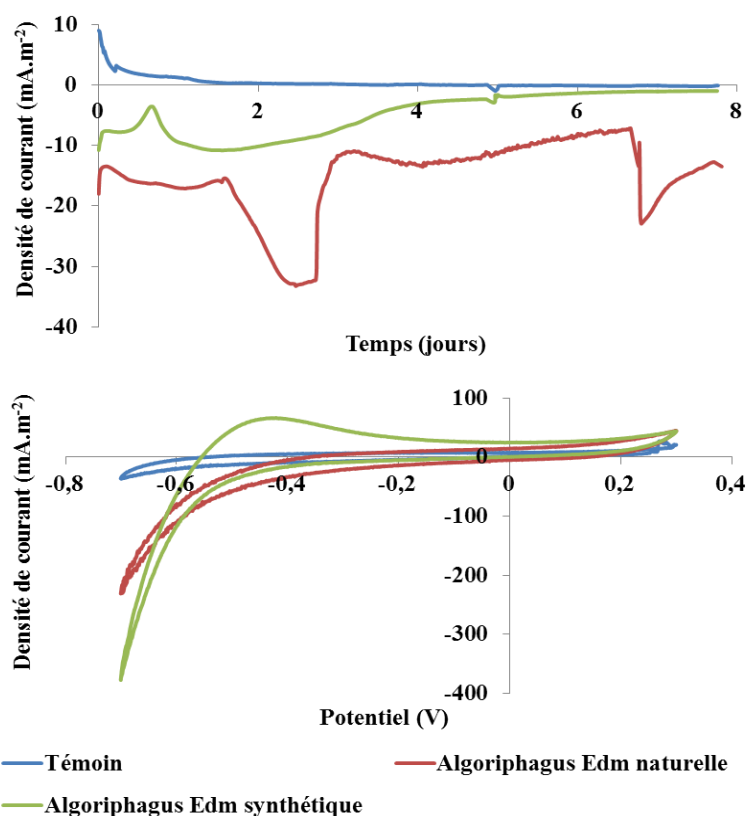


Figure IV-72 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,3 V/ECS, préalablement mise en contact ou non (Témoin) avec une culture bactérienne d'*Algoriphagus yeomjeoni*; en eau de mer synthétique et sous une agitation de 300 rpm. Les voltammétries cycliques ont été réalisées simultanément au 5^{ème} jour d'expérimentation.

Le potentiel imposé de $-0,3$ V/ECS, qui a permis l'observation des signaux de réduction du dioxygène avec nos 4 nouveaux isolats bactériens, permet également d'observer la catalyse de la réduction du dioxygène par *Algoriphagus yeomjeoni* à la cathode. Quelle que soit la souche bactérienne marine, il est nécessaire d'appliquer un potentiel de $-0,3$ V/ECS afin de rendre possible l'apparition du signal de réduction du dioxygène en eau de mer naturelle ou synthétique.

Des densités de courant sont observées en eau de mer naturelle et synthétique, elles sont respectivement d'environ -30 et -10 mA.m⁻² (Figure IV-72). Que ce soit en eau de mer naturelle ou synthétique aucune phase de latence n'est observée. Ceci n'était pas le cas avec les nouveaux isolats bactériens en eau de mer synthétique. L'hypothèse émise concernant le changement de mécanisme de transfert d'électron en eau de mer synthétique n'est donc plus valable. L'apparition d'une période de latence et d'un signal de réduction dès le démarrage des réacteurs est aléatoire et semble dépendre de la phase de contact cathode-inoculum bactérien de 1 heure qui a été mis en place dans le protocole de lancement des expérimentations électrochimiques.

On peut également constater que le courant cathodique est plus stable en eau de mer naturelle qu'en eau de mer synthétique révélant que l'eau de mer naturelle serait tout de même un milieu plus favorable pour *Algoriphagus yeomjeoni* et à son électroactivité.

IV.4.8) Conclusions

Pour la première fois, tous les microorganismes isolés sont capables de catalyser la réduction de l'oxygène sur acier inoxydable. Cette catalyse électromicrobienne est possible en eau de mer synthétique.

Nous avons pu démontrer que les bactéries hétérotrophes aérobies cultivables, isolées du biofilm sauvage, sont bien capables de réduire le dioxygène en eau sur des électrodes. De façon plus hypothétique, on pourrait imaginer que ce sont les bactéries hétérotrophes pigmentées (pigmented heterotrophic bacteria : PHB) qui participent à la réduction du dioxygène. En effet, les genres *Algoriphagus*, *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Roseobacter* et *Marinobacter* ont en commun la capacité de synthétiser des pigments, les caroténoïdes. La présence de caroténoïdes a été détectée chez des *Marinobacter* (Hamidi et al., 2012), chez des *Pseudoalteromonas* (Du et al., 2006). La production de caroténoïdes a aussi pu être identifiée chez les autres genres. Par exemple, les bactéries marines appartenant au genre *Bacillus* produisent de l'astaxanthine (Pane et al., 1996) ; les espèces bactériennes faisant partie du genre *Algoriphagus* synthétisent de la fléxixanthine (Tao et al., 2006) et les bactéries appartenant au genre *Roseobacter* fabriquent de la sphéroidenone (Shiba, 1991).

Cette particularité qu'elles ont en commun pourrait être au centre du mécanisme responsable des réactions de réduction du dioxygène mises en évidence dans le chapitre 3, car les caroténoïdes sont connus pour être des antioxydants efficaces en transformant le dioxygène et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ERO) en eau.

Ces PHB sont décrits dans la littérature comme nombreux dans les eaux de surface (Du et al., 2006). Il est donc tout à fait logique qu'on ait pu les isoler du biofilm sauvage car la colonisation des électrodes en acier inoxydable dans le port de Gênes a été réalisée au contact de ce type d'eau. Les caroténoïdes sont certainement une des réponses bactériennes à la forte présence de lumière et de dioxygène dans ces eaux de surface.

Toutefois, la finesse de ce(s) mécanisme(s) de réduction du dioxygène reste(nt) encore inconnus. Ils restent difficiles à percer pour l'instant car les biofilms électroactifs obtenus donnent encore de trop faibles performances et leur reproductibilité reste également très aléatoire.

IV.5) Conclusions sur ce chapitre et perspectives

L'analyse de la diversité microbienne au sein du biofilm cathodique « sauvage » formé dans le port de Gênes a révélé la présence de seulement deux phyla : Proteobacteria (79 %) et Bacteroidetes (21 %) (Annexe 7 et Figure IV-61). A l'intérieur du phylum Proteobacteria, la classe des Alpha- et surtout celle des Gammaproteobacteria étaient dominantes puisqu'elles représentent respectivement 7,5 et 71 % de la globalité des espèces qui composaient le biofilm. Concernant le phylum des Bacteroidetes, il comprend 3 familles : Bacteroidaceae, Cytophagaceae et Flavobacteriaceae. Cette dernière famille était vraiment dominante, elle représentait à elle seule près de 20 % de la biomasse totale. Les populations bactériennes présentes sur les biocathodes à oxygène sont relativement identiques à celles classiquement décrites dans les biofilms issus du milieu marin. Egalement, la présence de ces mêmes classes et phyla, essentiellement des Alpha- et Gammaproteobacteria et des Bacteroidetes, ont été mis en évidence au sein des communautés planctoniques dans l'eau de mer.

En ce qui concerne les espèces bactériennes cultivables et hétérotrophes, quatre souches ont pu être isolées à partir du biofilm marin « sauvage ». Ces souches appartiennent aux genres *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Roseobacter* et *Marinobacter*.

Ces quatre souches ont été capables de catalyser la réduction du dioxygène sur des électrodes en acier inoxydable. La flore électroactive que nous avons pu isoler du biofilm initial était donc identique à la flore cultivable hétérotrophe. Nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, que des isolats bactériens pouvaient catalyser la réduction du dioxygène en eau de mer synthétique au lieu de l'eau de mer naturelle. Lors de nos expériences, le caractère électroactif des souches n'a pu s'exprimer que lorsque les électrodes en acier inoxydable ont été polarisées à - 0,3 V/ECS. Ce changement du potentiel de l'électrode à cette valeur de - 0,3 V/ECS a également permis d'observer les propriétés électroactives de la souche *Algoriphagus yeomjeoni* que nous pensions perdues lors de travaux exposés dans le chapitre précédent.

Toutefois, les mécanismes de réduction du dioxygène mis en jeu par ces bactéries aérobies au métabolisme hétérotrophe restent encore inconnus. Ils restent difficiles à percer pour l'instant car les biofilms électroactifs obtenus donnent encore de trop faibles performances et que leur reproductibilité reste également très aléatoire. L'hypothèse que l'on soupçonne concernant le mécanisme de transfert d'électrons entre ces souches bactériennes et la cathode en acier inoxydable impliquerait des composés pigmentés. En effet, toutes les souches électroactives que nous avons isolées, sont capables selon la littérature, de produire des pigments et plus précisément des caroténoïdes. Cette particularité qu'elles ont en commun pourrait être au centre du mécanisme responsable des réactions de réductions mises en évidence dans ce chapitre, car les caroténoïdes sont connus pour être des antioxydants efficaces capables de transformer le dioxygène et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ERO) en eau.

Chapitre V

Capacités électroactives de *Lactococcus lactis*

Mise en évidence d'une catalyse de réduction du dioxygène

V.1) Contexte et objectifs de travail

V.1.1) Contexte

Lactococcus lactis a été décrit par Freguia et al. en 2009 comme une bactérie fermentaire capable d'échanger des électrons avec une électrode de carbone. Par ailleurs, en dehors du domaine de la catalyse électromicrobienne, cette bactérie lactique homofermentaire est très étudiée en recherche fondamentale. Son métabolisme est parfaitement connu et son génome est séquencé. *Lactococcus lactis* a donc le potentiel requis pour devenir un modèle d'étude des mécanismes de transfert électronique chez les bactéries à coloration de Gram positive qui ont longtemps été considérées comme des microorganismes non électroactifs.

Pour progresser rapidement dans la maîtrise des bases concernant la culture et la mise en œuvre de *Lactococcus lactis*, une collaboration a été initiée avec l'institut MICALIS (UMR INRA AgroParis Tech). La souche IL1403 est une souche de *Lactococcus lactis* n'exprimant pas de pili en surface mais capable de former des biofilms. L'équipe de MICALIS a su modifier génétiquement cette souche pour qu'elle devienne capable de synthétiser des pili (souche IL1403 pPil). Cette production de pili à la surface des cellules bactériennes donne lieu à la formation de biofilms plus épais et plus « aériens » (Oxaran et al., 2012).

Des problèmes de colonisation des électrodes dans les biocathodes formées avec des bactéries marines ont été rencontrés. La colonisation a pu être améliorée par des traitements de surface de l'électrode. Toutefois, une autre solution est d'utiliser des microorganismes génétiquement modifiés afin d'améliorer leur colonisation à un support solide comme *Lactococcus lactis* IL1403 pPil.

De plus, la possibilité de pouvoir manipuler génétiquement une souche bactérienne électroactive pourrait offrir une voie d'étude très innovante pour progresser dans la compréhension des mécanismes fondamentaux de transfert d'électrons. Mais avant d'en arriver à ce stade très élaboré de recherche fondamentale, le premier objectif, plus concret, est de caractériser les propriétés électroactives des deux souches modèles de *Lactococcus lactis* IL1403 et IL1403 pPil qui nous ont été fournies par l'institut MICALIS. Plusieurs objectifs de travail ont alors été mis en place à partir de ces deux souches.

Dans la suite du manuscrit, ces deux souches seront communément appelées « pil- » (souche 17232) et « pil+ » (souche 17173) pour des raisons de simplification.

V.1.2) Objectifs de travail

Les travaux pionniers de Freguia ont bien réussi à démontrer l'électroactivité de *Lactococcus lactis*. Or, les expériences ont été conduites en condition d'anaérobiose stricte et les performances électrochimiques d'oxydation sont restées assez faibles, de l'ordre de 30 mA.m⁻² (Freguia et al., 2009).

Notre premier objectif a donc été de reproduire les expériences de Freguia à partir des deux souches de *Lactococcus lactis* « pil- » et « pil+ » dont nous disposons. Nous avons donc tenté la formation d'anodes microbiennes de *Lactococcus lactis* sans toutefois éviter la présence d'oxygène dans le milieu réactionnel, comme l'avait fait Freguia. Le choix de travailler avec de l'oxygène dans le milieu est important pour le deuxième objectif de nos travaux qui visera la réalisation d'une cathode de *Lactococcus lactis* capable de réduire le dioxygène.

La présentation des résultats de ce chapitre est découpée en deux parties. La première partie est consacrée à la compréhension puis l'amélioration de la colonisation des souches de

Lactococcus lactis « pil- » et « pil+ » pour former des biofilms sur de l'acier inoxydable. Des travaux de transformations avec des plasmides *gfp* ont alors été entrepris afin de pouvoir réaliser des tests de colonisation en temps réel avec les deux souches. Ces tests de colonisation ont eu d'abord comme finalité d'étudier l'influence de différents paramètres (concentration de substrat : le glucose, d'hémine ou de NaCl) sur la formation des biofilms puis de constater les différences de colonisation entre les deux souches « pil- » et « pil+ ». La seconde partie, elle, regroupe les résultats sur l'étude de l'électroactivité de *Lactococcus lactis* dans l'optique (i) d'améliorer les performances anodiques et (ii) d'évaluer si une catalyse cathodique est envisageable. En effet, une réaction de réduction du dioxygène est-elle réalisable par une électrode colonisée par un biofilm de *Lactococcus lactis* ? Et, si oui par quel mécanisme ?

V.2) Tests de colonisation

Tous les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés à l'occasion d'un stage de thèse à l'institut MICALIS sous l'encadrement du Dr Jean-Christophe PIARD.

V.2.1) Transformation de *Lactococcus lactis*

L'intérêt de posséder des souches « pil- » et « pil + » autofluorescentes est de pouvoir suivre en temps réel la colonisation de l'électrode en parallèle à l'évolution de la production de courant. Ainsi, il serait plus facile de déterminer l'influence des pili sur les performances électrochimiques. Des plasmides porteurs du gène codant pour la Gfp ont alors été introduits dans les cellules des souches « pil- » et « pil + » par électroporation.

La première étape a été d'extraire ces plasmides qui sont initialement présents dans les souches : 17228 (contient le plasmide pGhost8gfp), 17229 (contient le plasmide pIL2608gfp) et 17231 (contient le plasmide pMV518gfp). Afin de vérifier la réussite de l'extraction plasmidique, une digestion plasmidique à l'aide d'une enzyme de restriction (EcoRI) suivie d'une migration sur gel ont été effectuées sur le matériel génétique extrait de chaque échantillon. Le protocole d'extraction a été détaillé dans les [Annexes 5 et 6](#), la préparation de la digestion par l'enzyme de restriction EcoRI a été décrite en [Annexes 8](#) et la préparation/révélation du gel a été présentée dans le paragraphe II.3.2) du Matériel et méthodes.

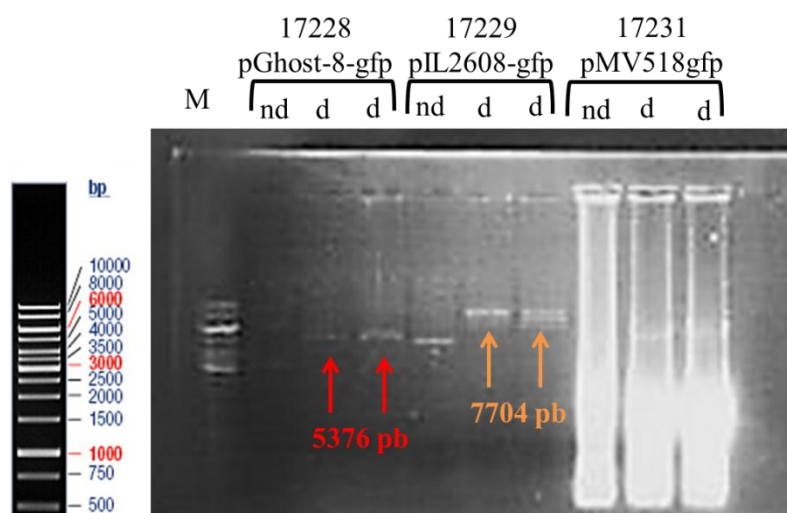


Figure V-73 : Séparation électrophorétique des fragments d'ADN plasmidique extraits des souches 171128, 17229 et 17231. M : marqueur de taille, nd : plasmide non digéré et d : plasmide digéré.

Les deux bandes (2 flèches rouges), correspondant aux plasmides digérés provenant de la souche 17228, se situent environ entre la 4^{ème} et 3^{ème} bande du marqueur de taille révélant un matériel génétique compris entre 5000 et 6000 paires de bases (pb) (Figure V-73). Cela prouve que le plasmide extrait est bien pGhost8gfp qui présente 5376 pb (Annexe 9). De même, les deux bandes (2 flèches orange), correspondant aux plasmides digérés provenant de la souche 17229, se situent environ entre la 3^{ème} et 2^{ème} bande du marqueur de taille révélant un matériel génétique compris entre 6000 et 8000 paires de bases (pb). Cela prouve que le plasmide extrait est bien pIL2608gfp qui présente 7704 pb (Annexe 9). Par contre, avec les extraits plasmidiques de la souche VE 17231, des smears (multitudes de bandes) apparaissent sur le gel, l'ADN a donc été digéré avec une forte fréquence de coupure rendant impossible l'identification du plasmide.

Les cellules bactériennes ont été rendues « compétentes », c'est-à-dire qu'elles ont subi un traitement afin qu'elles soient aptes à recevoir du matériel génétique exogène (cf. Paragraphe II.3.2.c). Au vu de l'intensité des bandes révélées sur le gel d'électrophorèse, il a été ajouté 3 μ L de plasmide pGhost8gfp (17228), 1 μ L de plasmide pIL2608gfp (17229) et 5 μ L de plasmide pMV158gfp (17231) dans les cuves électroporétiques. La transformation et la révélation des transformants (cellules bactériennes ayant incorporé un des plasmides) ont été réalisées comme présenté dans le paragraphe II.3.2.d).

Pour faciliter leur identification, des codes ont été attribués aux lots de transformants :

	VE 17228 (Tet ^R)	VE 17229 (Tet ^R)	VE 17231 (Tet ^R)
VE 17232 (Δ pPil)	Δ 8 (Tet ^R)	Δ 9 (Tet ^R)	Δ 31 (Tet ^R)
VE 17173 (pPil+) (Ery ^R)	+8 (Ery ^R) (Tet ^R)	+9 (Ery ^R) (Tet ^R)	+31(Ery ^R) (Tet ^R)

Ainsi, une cellule bactérienne « pil- » (17232) ayant acquis un plasmide provenant de la souche 17228 a été nommée Δ 8.

Une extraction plasmidique suivie d'une digestion puis migration sur gel ont été réalisées à partir de trois colonies de transformants. L'extraction a été réalisée par le kit Invitrogen

PureLink (Annexe 5), la préparation de la digestion par les enzymes de restriction XhoI et EcoRI a été décrite en Annexe 10 et la préparation/révélation du gel a été présentée dans le paragraphe II.3.2) du Matériel et méthodes.

Les plasmides sont ajoutés au mélange réactionnel à raison de 6 μ L pour visualiser pIL (plasmide pil+) qui est en bas nombre de copies et 2 μ L pour visualiser le plasmide pGhost8gfp qui est en grand nombre de copies.

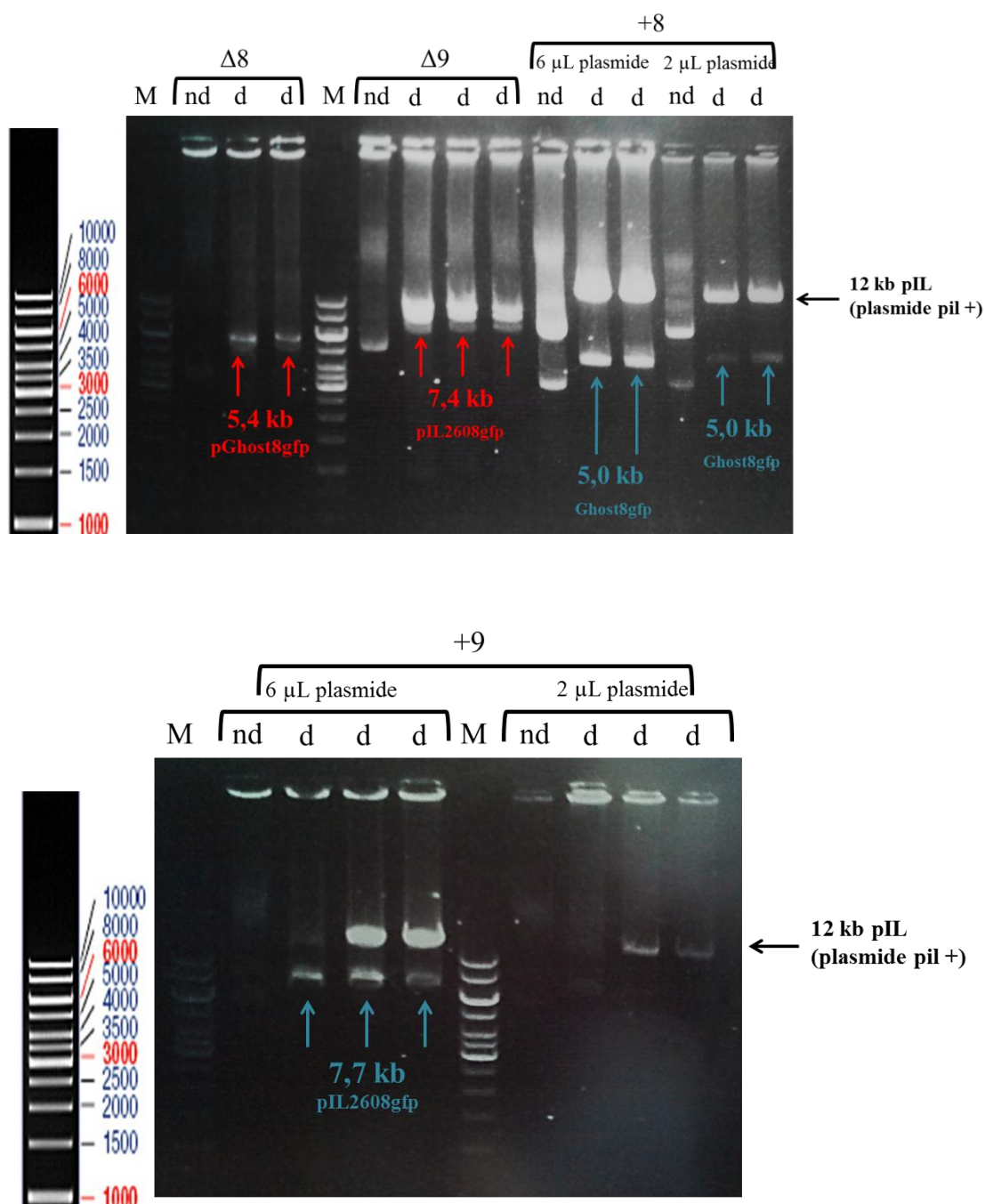


Figure V-74 : Séparation électrophorétique des fragments d'ADN plasmidique des transformants Δ8, Δ9, +8 et +9. (Rouge : digestion avec EcoRI et Bleu : digestion avec XhoI).

Deux enzymes de restriction ont été utilisées et les tailles des fragments plasmidiques attendus avec celles-ci sont de :

	pIL	pGhost8-gfp	pIL2608-gfp
XhoI	12 kb	5 et 0,3 kb	7,7 et 0,3 kb
EcoRI	-	5,4 kb	7,4 kb

Les bandes révélées sur le gel correspondent effectivement à la taille de fragments attendus par les deux enzymes de restrictions (Figure V-74). Ainsi, non seulement les transformants présentent une résistance à la tétracycline signe de l'incorporation du plasmide porteur de la *gfp*. Mais, la digestion et la révélation sur gel prouvent véritablement cette incorporation plasmidique par électroporation. Les souches ont été transformées avec succès.

La poursuite des expériences, i.e. les tests de colonisation, a également été réalisée à l'institut MICALIS. Par contre, les supports habituels d'électrodes en acier inoxydable ne peuvent pas être utilisés pour les tests d'adhésion. Ainsi, les coupons d'acier inoxydable ont été remplacés par des supports transparents, des microplaques et des cellules à flux continu.

V.2.2) Tests de colonisation en microplaques avec la souche « pil + »

Plusieurs séries de tests de colonisation ont été réalisés avec la souche « pil + » non transformée.

La présence et/ou la concentration en MOPS (acide morpholino-3-propanesulfonique), en hémine et en NaCl peuvent avoir une influence sur le métabolisme de *Lactococcus lactis* et/ou sur les performances électrochimiques. Toutefois, ces composés peuvent également avoir une influence sur la formation du biofilm par *Lactococcus lactis*. Or, en vue des expériences électrochimiques envisagées, nous recherchons plutôt à obtenir un biofilm épais et aéré pour faciliter les échanges (nutriments, protons et surtout possibles médiateurs électrochimiques) à l'intérieur de la structure tridimensionnelle du biofilm.

Le pH a été le premier paramètre étudié. En effet, lors de la fermentation homolactique *Lactococcus lactis* produit de l'acide lactique qui acidifie fortement le milieu environnant (CocaignBousquet et al., 1996). Afin de limiter cette acidification, un tampon a été ajouté au milieu, le MOPS (solution tampon pour un pH proche de la neutralité).

Le deuxième paramètre concernait la concentration en sel, NaCl. Ce paramètre a été choisi en vue des expériences électrochimiques. En effet, plus la concentration en sel est élevée (ions en solution), plus la conductivité ionique augmente ce qui est favorable à la conception de procédés électrochimiques.

Le troisième paramètre était l'effet de l'ajout d'hémine et sa concentration dans le milieu de culture. Cette substance a la particularité de permettre à *Lactococcus lactis* de respirer (Kaneko et al., 1990). En effet, à l'exception de la voie de synthèse d'hème, tous les éléments de la chaîne respiratoire sont présents chez *Lactococcus lactis*. L'hémine apporte donc l'hème, une molécule de porphyrine contenant des ions de fer ferrique qui permet de fixer l'oxygène et qui est indispensable pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire de *Lactococcus lactis*.

La préparation des solutions et de la microplaque a été détaillée en [Annexe 11](#). La microplaque a été incubée une nuit à 30°C et en condition statique

Tous les résultats en termes de biovolume et d'épaisseur des biofilms sont présentés dans l'[Annexe 12](#). Les moyennes de ceux-ci sont regroupées dans l'histogramme suivant.

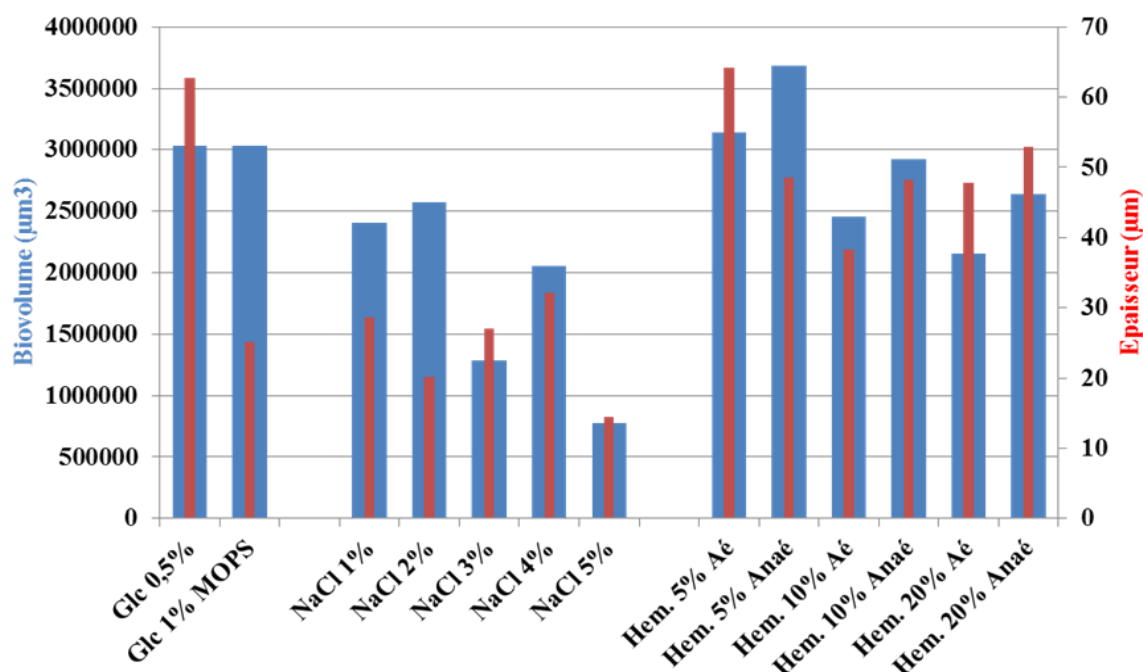


Figure V-75 : Histogramme représentant la moyenne des biovolumes et d'épaisseur des biofilms lors des tests de colonisation de *Lactococcus lactis* en fonction de différents paramètres.

La condition de culture dite « standard », est la condition utilisée en routine pour la culture de *Lactococcus lactis*, et sert également de **témoin** par rapport aux différentes conditions testées. Elle correspond à une inoculation dans du milieu M17 supplémenté en glucose 0,5 %, à 30°C et en condition statique.

Dans cette condition « standard » le biofilm de *Lactococcus lactis* a présenté un biovolume d'environ 3 000 000 µm³ et une épaisseur d'environ 65 µm (Figure V-75). Chaque résultat obtenu dans de nouvelles conditions expérimentales est systématiquement comparé au résultat de référence obtenu en milieu standard. Ainsi, l'influence de la concentration en MOPS sur l'adhésion de *Lactococcus lactis* a été testée.

V.2.2.a) Influence du tampon MOPS sur la formation de biofilm de *Lactococcus lactis*

Lors de la fermentation du glucose, *Lactococcus lactis* acidifie fortement le milieu environnant. Il a donc été décidé de tamponner le milieu avec du tampon MOPS à 200 mmol.L⁻¹. Bien que la concentration en glucose ait été doublée, le biovolume reste inchangé. Et, l'épaisseur du biofilm a presque été divisée par 3. L'épaisseur des biofilms n'excède pas 25 µm.

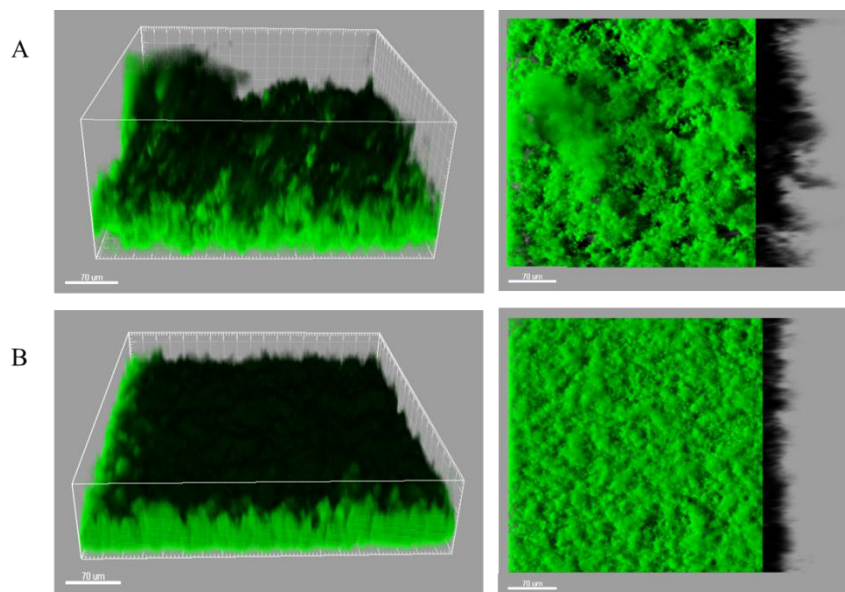


Figure V-76 : Images de microscopie confocale des biofilms de *Lactococcus lactis* en milieu M17 Glucose 0.5 % (Témoin) (A) et Glucose 1% MOPS 200 mM (B).

En effet, la Figure V-76 montre un biofilm plus épais et aéré avec une concentration de 0,5 % en glucose alors que celui obtenu avec une concentration de 1 % en présence de MOPS apparaît plus fin et plus compact. La présence de MOPS qui assure la stabilité du pH autour de 7 a un effet négatif sur la formation du biofilm par *Lactococcus lactis*.

V.2.2.b) Influence du NaCl sur la formation de biofilm de *Lactococcus lactis*

Toujours en prévision des futures expériences électrochimiques, des concentrations en NaCl croissantes ont été testées (1 à 5 %). Plus la concentration en NaCl est élevée plus la conductivité augmente favorisant le transport de charges en solution.

Mais, quels sont les effets des concentrations croissantes en sel sur le biofilm de *Lactococcus lactis* ?

Les concentrations testées varient de 1 à 5 % en NaCl dans un milieu M17 supplémenté en glucose à 0,5 %. L'effet du NaCl s'est manifesté par une baisse du biovolume dès 1 % (Figure V-75). Ce dernier était inférieur à 1 000 000 μm^3 en présence de 5 % de NaCl. L'effet a également été significatif sur l'épaisseur du biofilm, qui avoisinait les 20 μm quelle que soit la concentration en NaCl.

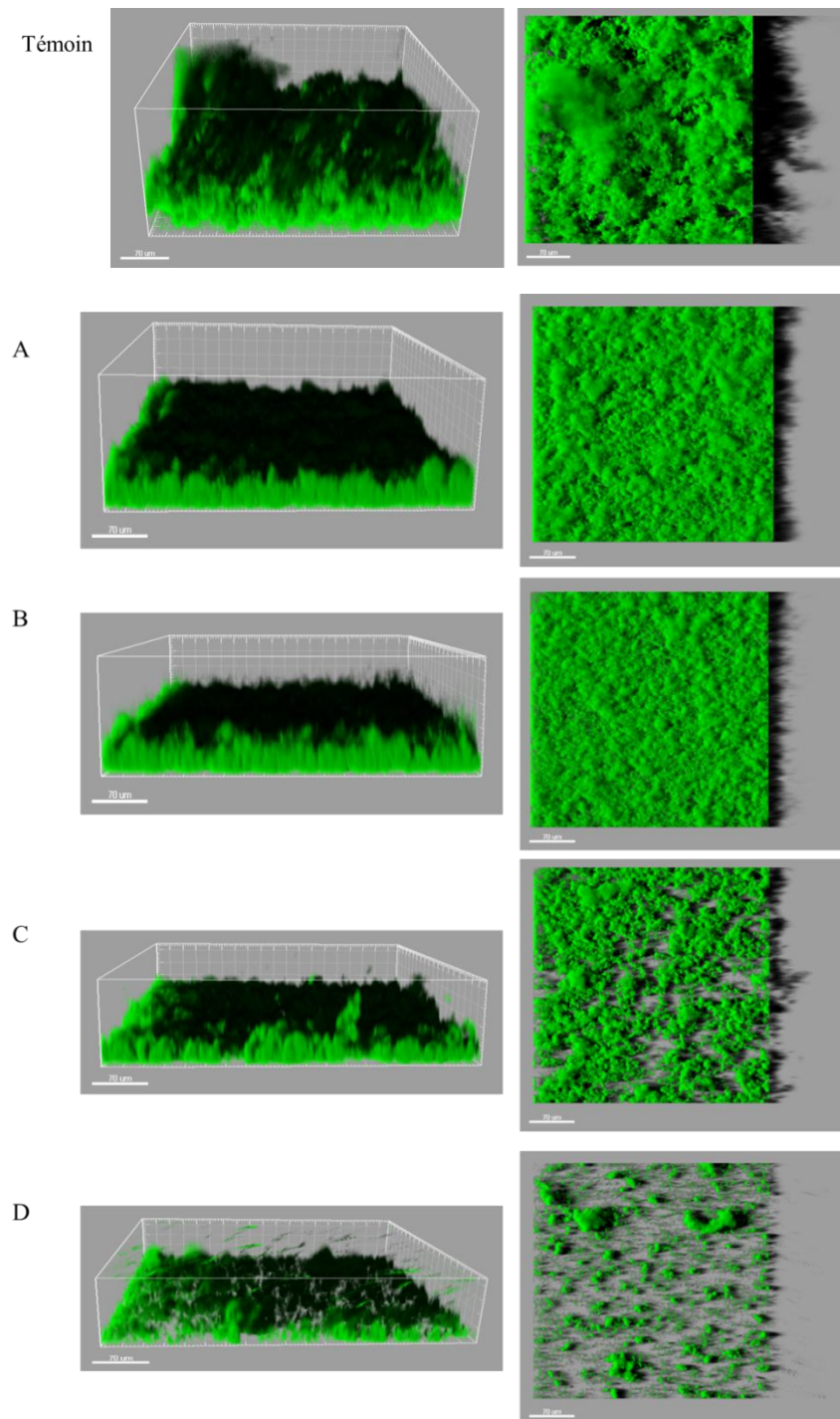


Figure V-77 : Images de microscopie confocale des biofilms de *Lactococcus lactis* en milieu M17 Glucose 0.5 % (Témoin) et NaCl 1 % (A), 2 % (B), 3 % (C) et 5 % (D).

Les images obtenues du biofilm de *Lactococcus lactis* en présence de ces différentes concentrations ont bien montré ces tendances (Figure V-77). En effet, plus la concentration en NaCl augmente (A : 1 % vers D : 5 %) plus la quantité de cellules microbiennes diminue (diminution du biovolume). Un biofilm très compact a été observé en présence de 1 et 2 % de NaCl. A partir de 3 % en NaCl, la diminution de la population microbienne des biofilms était encore plus visible.

Le NaCl ralentit le processus de maturation du biofilm par inhibition de la croissance bactérienne et en réduisant l'épaisseur du biofilm (Katebian & Jiang, 2013). La diminution de l'épaisseur du biofilm pourrait être causée par la perturbation du réseau d'interactions électrostatiques et en cassant les liaisons entre les molécules composant la matrice du biofilm (Lee & Elimelech, 2007). Bien que la présence de NaCl soit un avantage dans les procédés électrochimiques, il présente un double inconvénient sur la formation de biofilm de *Lactococcus lactis*. Sa présence engendre des biofilms plus compacts dès 1 % en concentration. Egalement, des concentrations au-delà de 3% de NaCl entraînent une inhibition de la croissance bactérienne visualisée par une diminution nette du nombre de cellules dans les biofilms.

V.2.2.c) Influence de l'hémine sur la formation de biofilm de *Lactococcus lactis*

Les concentrations en hémines testées ont été de 5, 10 et 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ces concentrations ont été choisies à partir du travail de Kaneko et al. (1990), qui a réalisé ses expériences à 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'hémine. Cette concentration a été reprise dans nos tests et des essais avec des concentrations 2 fois plus faibles ou 2 fois plus importantes ont également été réalisés. Aussi, pour évaluer le réel effet dû à la respiration, les tests en présence d'hémine se sont déroulés en aérobiose et en anaérobiose (ajout d'un film de paraffine liquide dans les puits concernés).

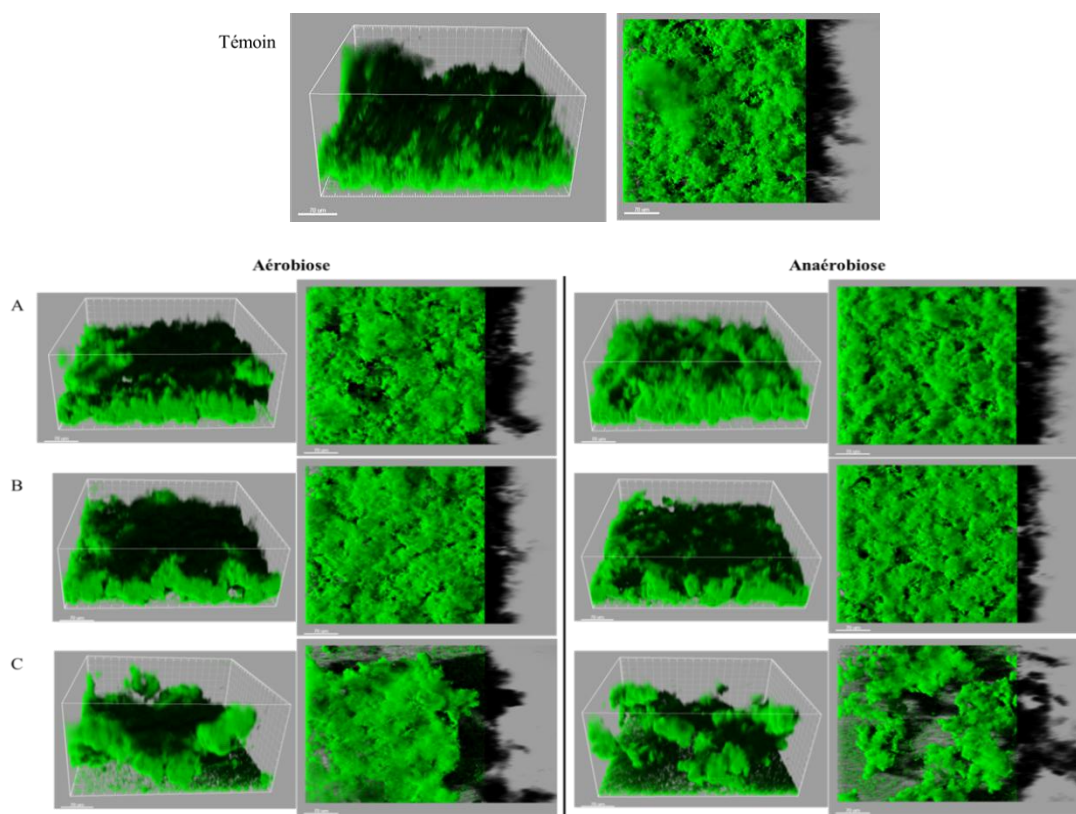


Figure V-78 : Images de microscopie confocale des biofilms de *Lactococcus lactis* en milieu M17 Glucose 0.5 % (Témoin) et supplémenté avec une concentration en hémine de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A), 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B) et 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C).

Que ce soit en aérobiose ou en anaérobiose, l'augmentation de la concentration en hémine a entraîné une chute du biovolume des biofilms. En effet, celui-ci passe d'un peu plus de 3 000 000 à un peu plus de 2 000 000 μm^3 en aérobiose et d'environ 3 700 000 à environ 2 600 000 μm^3 en anaérobiose, lorsque la concentration en hémine passe de 5 à 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure V-75 et V-78). En effet, avec une concentration en hémine de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, le biofilm formé est apparu plus « clairsemé » en aérobiose et en anaérobiose. Par contre, l'impact de la présence d'hémine sur l'épaisseur du biofilm a été moins net. En effet, l'épaisseur des biofilms formés en présence d'hémine avoisinait les 50 μm quelle que soit sa concentration ou l'atmosphère appliquée sauf pour la condition où la concentration en hémine est de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ sous aérobiose. Selon une autre étude, la présence d'hémine permettrait d'augmenter la densité cellulaire ainsi que la vitesse de croissance (Lan et al., 2006), ce qui paraît contradictoire avec l'observation de la diminution du biovolume observé dans nos essais. Il semblerait que *Lactococcus lactis* n'a pas pu mettre en place une respiration avec nos conditions opératoires. En termes de données, les essais réalisés en condition « standard », c'est-à-dire en milieu M17 supplémenté en glucose 0,5 %, ont représenté la meilleure condition expérimentale afin de former des biofilms de *Lactococcus lactis* avec un fort biovolume et une grande épaisseur de biofilm.

V.2.3) Tests de colonisation en microplaques : souche « pil + » vs « pil – »

Les essais présentés jusqu'ici ont été réalisés avec une souche dite « pil+ », qui a reçu un plasmide pIL portant les gènes nécessaires à la production et la formation des pili (souche 17173). Il serait également intéressant de visualiser la différence de formation du biofilm entre une souche dite « pil- » et une souche dite « pil+ ». Ces expériences ont été réalisées avec les transformants exprimant la Gfp afin de valider la bonne fluorescence émise par les microorganismes portant un des trois plasmides porteurs du gène *gfp*. Cette expérience a été menée en microplaque (plan en Annexe 13) dans les mêmes conditions que l'expérience précédente, à savoir une incubation d'une nuit à 30°C et en statique.

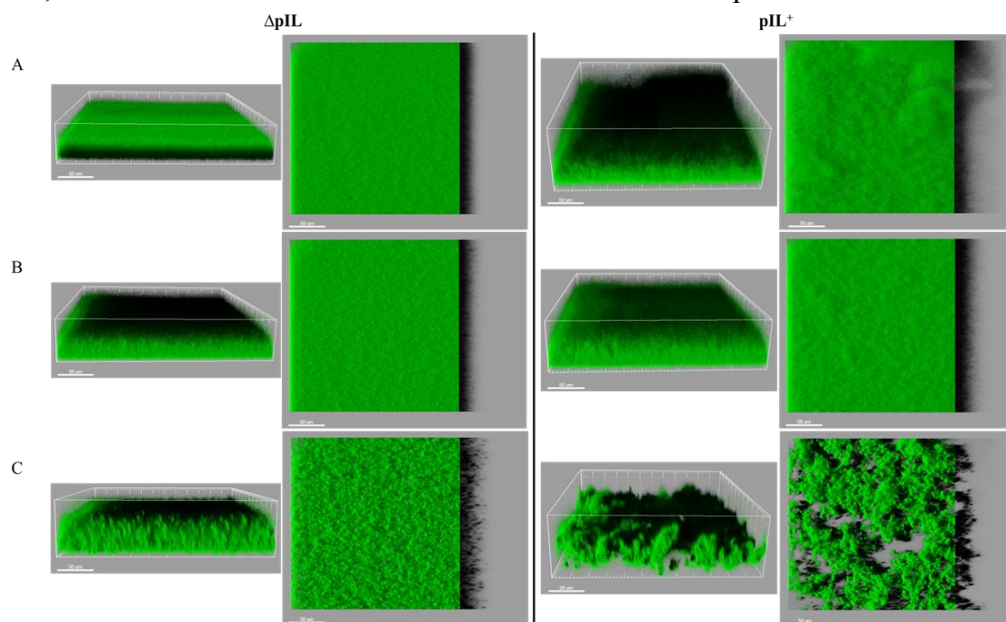


Figure V-79 : Images de microscopie confocale des biofilms des transformants « pil – » et « pil + » ayant incorporé un plasmide issu des souches : 17228 (A), 17229 (B) et 17231 (C) en milieu M17 Glucose 0.5 %.

L'observation des biofilms formés par les souches transformées n'a pas été fructueuse. En effet, bien que les plasmides soient bien présents dans les microorganismes, certaines cellules bactériennes dans les biofilms ne semblaient pas fluorescer. Pour pouvoir réellement visualiser la totalité des biofilms, un marquage au Syto 9 a été effectué (cf. paragraphe II.3.3 Préparation des échantillons).

Les transformants « pil – » et « pil + » ayant incorporé un plasmide issu des souches 17228 ou 17229 ($\Delta 8$, +8, $\Delta 9$ et +9), présentent des biofilms plutôt similaires (A et B de la [Figure V-79](#)). Par contre, pour la souche 17131 ($\Delta 31$ et +31), une nette perte du nombre de cellules adhérentes a été observée. Malgré une quantité plus faible de cellules, le biofilm formé par la souche +31 est plus aéré et présente des structures de type « champignon » ce qui n'est pas le cas pour la souche $\Delta 31$. L'incorporation du plasmide semble avoir modifié la structure des biofilms des transformants « pil + » sauf pour la souche +31. En effet, les transformants +8 et +9 ont formé des biofilms plus compacts et moins épais que la souche non transformée (cf. paragraphe précédent). Cette modification de la structure tridimensionnelle des biofilms pourrait avoir un impact sur les performances électrochimiques. De plus, bien que l'incorporation des plasmides porteurs du gène *gfp* ait été prouvée lors de la lecture des gels électrophorétiques réalisés à partir des extractions plasmidiques effectuées sur les transformants, certaines cellules ne fluorescent pas.

L'intégration d'un nouveau plasmide semble avoir modifié la structure des biofilms formés par la souche « pil + ». De plus, l'ensemble des transformants ne fluoresce pas. Nous allons chercher à comprendre la cause de ce phénomène.

V.2.4) Recherche de conditions expérimentales favorisant la fluorescence de la protéine Gfp

Ce phénomène d'absence de fluorescence de certaines cellules microbiennes peut s'expliquer par différentes raisons. En effet, plusieurs conditions dépendantes du microorganisme doivent être réunies pour visualiser en microscopie une fluorescence due à la présence de la protéine Gfp :

- - une certaine quantité de Gfp doit être exprimée par la cellule,
 - - une étape post-traductionnelle d'oxydation en présence de dioxygène est nécessaire.
- Or, suivant l'architecture du biofilm il peut exister des zones anoxiques où le dioxygène se fait plus rare n'activant pas la Gfp.

Egalement, ce manque de fluorescence observé chez certaines cellules, peut être lié à l'environnement bactérien. De la même façon que le dioxygène, la concentration en protons et donc le pH n'est pas homogène dans le biofilm et *Lactococcus lactis* est connu pour fortement acidifier le pH environnant. Or, la Gfp est inactivée en pH acide (environ 4). Pour pallier l'apparition d'une chute de pH trop drastique, une expérience de colonisation a été réalisée dans une cellule à flux continu (non plus en condition statique). Aussi, il ne faut pas oublier la présence d'antibiotiques utilisés pour maintenir une pression de sélection sur les souches porteuses du plasmide contenant le gène de la *gfp*, la tétracycline. La tétracycline inhibe la croissance bactérienne en inhibant la synthèse protéique. Or, la Gfp est une protéine. La présence de tétracycline est indispensable pour maintenir le plasmide dans les cellules transformées mais sa concentration finale dans le milieu mérite peut être d'être optimisée. Habituellement, la tétracycline est ajoutée au milieu à raison de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Des expériences complémentaires ont été réalisées en microplaques avec des concentrations finales en tétracycline plus faibles, soit 2 et 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

V.2.4.a) Stabilisation du pH en cellule à flux continu

La souche choisie pour ce test était la souche +9, et deux conditions expérimentales différentes ont été testées :

- La condition « standard » : milieu M17 supplémenté en glucose 0,5 %,
- En milieu M17 supplémenté en galactose 0,5 %. L'utilisation du galactose induit une baisse de pH plus modérée que celle induite par l'utilisation du glucose, c'est pourquoi il a été choisi pour un des essais (Salako & Kleinberg, 1992).

Du milieu approprié à chaque essai passe dans le système de cellule à flux continu. Puis chaque cellule a été inoculée au 1/100^{ème} avec la souche +9 et incubée à 30°C pendant 1 heure en batch. A la suite de cette phase statique, un flux constant de milieu est passé en continu dans chaque canal pendant 19 heures à 30°C.

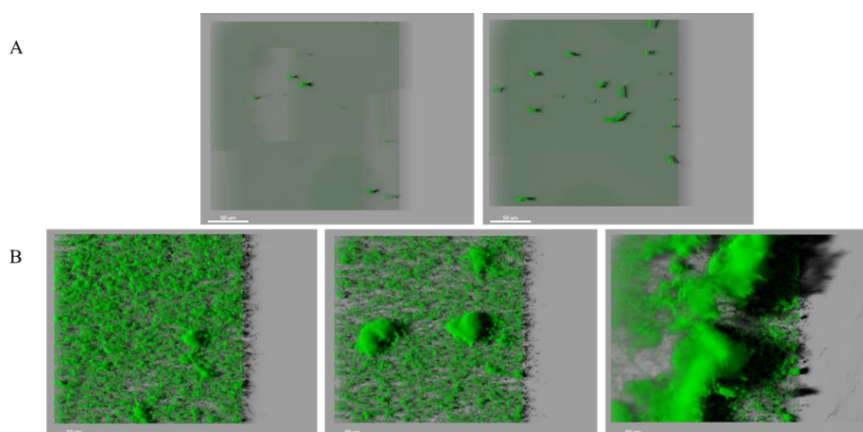


Figure V-80 : Images de microscopie confocale des biofilms du transformant +9 en milieu M17 supplémenté en galactose 0,5 % (A) et en milieu M17 supplémenté en glucose 0,5 % (B).

Première constatation, les microorganismes n'étaient pas directement observables, c'est-à-dire qu'il n'y avait pas de fluorescence directement détectée aux longueurs d'onde caractéristiques de la Gfp quelle que soit la condition expérimentale testée. Un flux continu permettant une meilleure régulation du pH n'a pas eu l'effet escompté, c'est-à-dire permettre une fluorescence par toutes les cellules composant le biofilm de *Lactococcus lactis*. Une coloration au Syto 9 a donc été réalisée afin de permettre l'observation des biofilms.

D'après les images de microscopie, le galactose n'a pas du tout permis la croissance de la souche +9 (Figure V-80). Notre souche de *Lactococcus lactis* ne possède peut-être pas une ou plusieurs enzymes nécessaires pour croître sur galactose, telles que la galactokinase ou la galactose perméase (Neves et al., 2010).

V.2.4.b) Influence de la concentration en antibiotique assurant la pression de sélection, la tétracycline

Habituellement, la concentration de tétracycline ajoutée aux différentes cultures bactériennes était de 5 µg.mL⁻¹. Une nouvelle série d'expériences en microplaque a été réalisée avec la souche +31 en présence de différentes concentrations en tétracycline afin de voir son impact sur la croissance de la souche de *Lactococcus lactis* et la fluorescence de la Gfp. Trois concentrations d'antibiotique ont été testées en triplicata (3 puits) : 0, 2 et 4 µg.mL⁻¹.

L'inoculation a été réalisée en microplaque (dans un volume final de 150 μL par puits et sous condition statique). Les puits ont été observés après 21 heures d'incubation à 30°C.

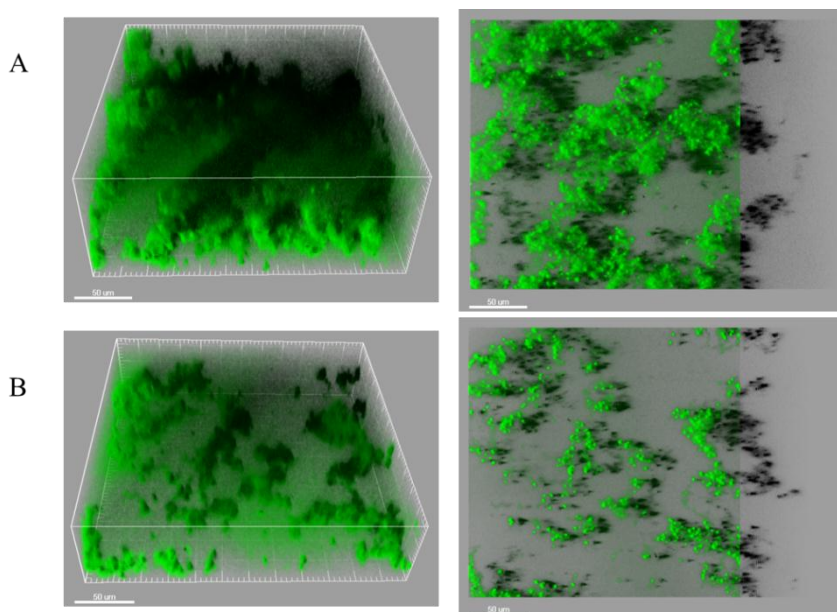


Figure V-81 : Images de microscopie confocale des biofilms du transformant +31 en milieu M17 supplémenté en glucose 0,5 % et en tétracycline à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A) et à 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B).

En absence de tétracycline, aucune fluorescence n'a été observée. L'absence de la pression de sélection a probablement causé la perte du plasmide et donc de la fluorescence. Par contre, l'ajout de tétracycline à hauteur de 2 et 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ permet d'observer directement la fluorescence (Figure V-81). Cependant, le biovolume mesuré n'est pas très important bien qu'il soit visiblement augmenté lorsque la concentration de tétracycline est diminuée de 4 à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La tétracycline a donc un impact négatif sur la croissance bactérienne de la souche +31. Elle pourrait également avoir un impact sur la fluorescence de toutes les souches transformées car son mode d'action est d'inhiber la synthèse des protéines dont fait partie la Gfp.

En complément, l'expérience a été renouvelée avec l'ensemble des souches transformées (+8, +9 et +31) et 4 concentrations en tétracycline ont été testée : 1, 2, 3 et 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Après 17 heures de culture à 30°C aucune fluorescence n'a pu être détectée.

L'insertion plasmidique a fonctionné et les souches de *Lactococcus lactis* transformées portent les plasmides contenant le gène *gfp*. Cependant la fluorescence n'est pas détectable chez les cellules transformées. Le pH, ainsi que l'antibiotique permettant le maintien des plasmides porteurs de la *gfp* ne semblent pas être la cause de cette absence de fluorescence chez certaines cellules.

Le suivi de la colonisation des électrodes ne pourra donc pas être réalisé en temps réel, de façon non destructive au cours du suivi de la production de courant.

V.3) Tests électrochimiques

L'électroactivité de *Lactococcus lactis* a déjà été démontrée mais en condition d'anaérobiose. De plus, les performances électrochimiques d'oxydation sont restées assez faibles, de l'ordre de 30 mA.m^{-2} (Freguia et al., 2009). Lors de nos travaux nous avons l'intention de former des anodes microbiennes de *Lactococcus lactis* en présence de dioxygène dans le milieu réactionnel. La présence de dioxygène est nécessaire car nous avons pour objectif final de réaliser une biocathode où le biofilm formé par *Lactococcus lactis* sert de catalyseur de la réduction de celui-ci.

V.3.1) Choix du milieu

Dans un premier temps, il a fallu définir le milieu le mieux adapté pour les expériences électrochimiques. Le choix a été effectué entre 3 milieux :

- le milieu « Resting cells » (RC) s'apparente à un tampon phosphate et ne permet pas la croissance cellulaire,
- un milieu chimique défini (MCD) qui est un milieu synthétique dont la composition chimique est totalement maîtrisée et qui contient toutes les substances nécessaires à la croissance de *Lactococcus lactis*,
- et le milieu M17, qui est le nom commercial du milieu de culture dit « riche » considéré comme le milieu de culture « standard » ; il a été conçu de façon empirique avec des extraits de levure et de viande, sa composition précise n'est pas connue.

V.3.1.a) Milieu Resting Cell

Les souches « pil- » et « pil+ » ont donné des chronoampérogrammes identiques dans le milieu RC (Figure V-82). Les densités de courant obtenues sont d'environ 9 mA.m^{-2} dès le début de l'expérience, alors que le témoin abiotique n'a donné aucun courant. Le courant élevé dès le début de la polarisation indique la présence de cellules microbiennes sur l'électrode de travail résultant de la phase d'adhésion préliminaire de 3 heures. Le courant a chuté fortement après quelques heures jusqu'à être nul après environ 20 heures de polarisation.

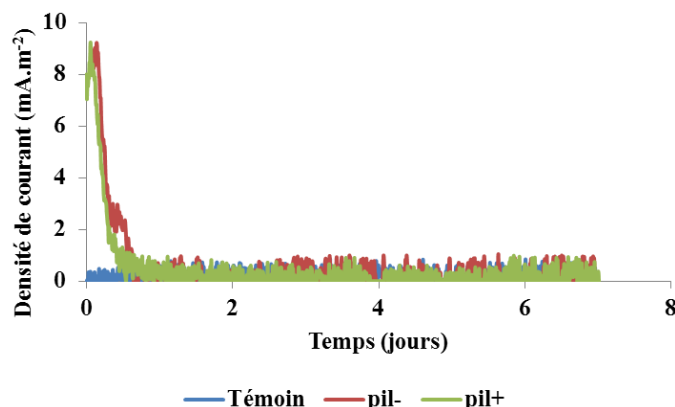


Figure V-82 : Chronoampérogramme réalisé à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS en milieu « Resting cell ».

Une étude de Freguia et al. a été réalisée dans le même milieu et a donné une densité de courant de 3 A.m^{-3} dans un volume de 100 mL, maintenue sur une durée de 3 heures (Freguia

et al., 2009). Avec une surface d'électrode de $101,75 \text{ cm}^2$ ($18,5 * 5,5 \text{ cm}$) la densité de courant était d'environ 30 mA.m^{-2} , donc trois fois plus élevée que celle obtenue ici. Toutefois les deux expériences n'ont pas été menées dans les mêmes conditions opératoires. L'électrode de travail utilisée par Freguia était du feutre de carbone pyrolytique, avec sans doute une surface spécifique plus importante que celle du tissu de carbone utilisé ici, et l'expérience a été réalisée sous une atmosphère anaérobie stricte. Que ce soit dans la bibliographie ou dans nos expérimentations, les densités de courant obtenues avec le milieu RC restent faibles. Ce milieu similaire à un tampon phosphate n'est donc pas un milieu vraiment adapté à l'observation de l'électroactivité de *Lactococcus lactis*.

V.3.1.b) Milieu M17

Les chronoampérogrammes réalisés en milieu M17 (Figure V-83) ont donné des profils similaires entre les souches « pil- » et « pil+ ». Le courant a démarré de 0 mA.m^{-2} puis a atteint une densité de courant d'environ 60 mA.m^{-2} en 24 heures. Le courant maximal a été atteint en 4 jours avec environ 80 mA.m^{-2} . A partir du 4ème jour, les densités de courant ont chuté progressivement et n'étaient toujours pas nulles après 10 jours.

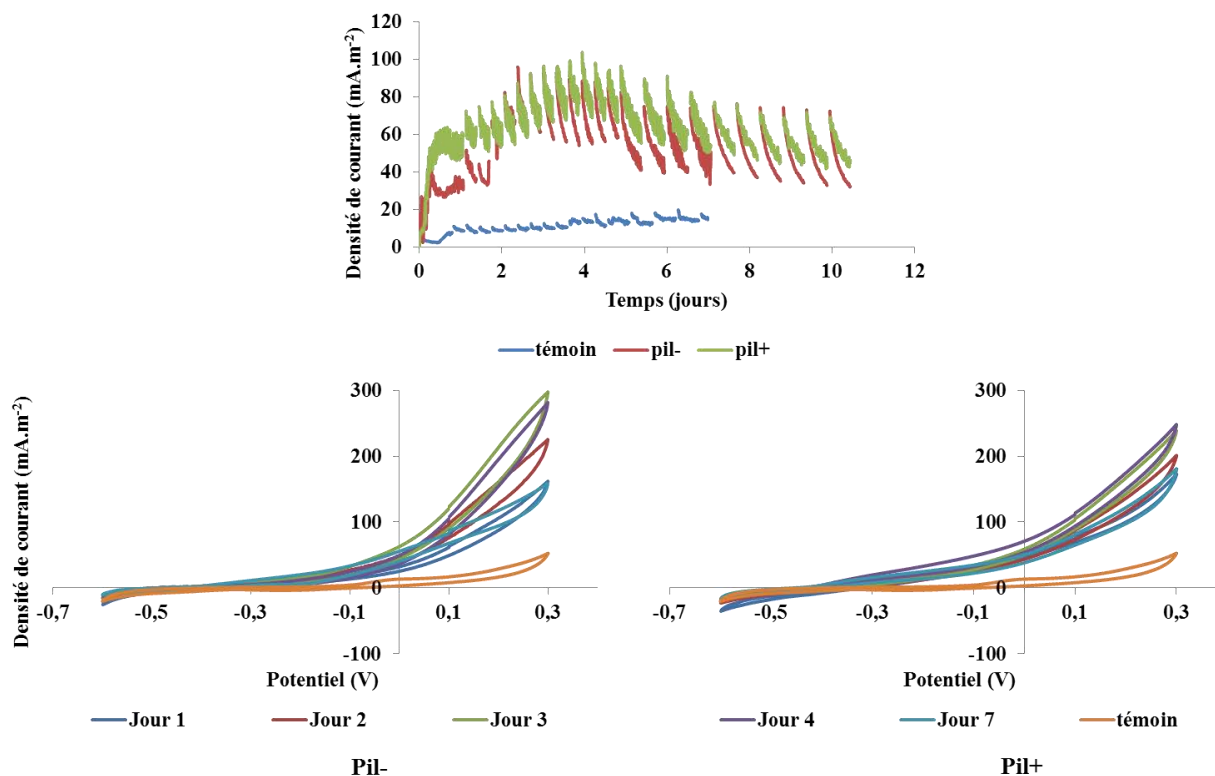


Figure V-83 : Chronoampérogramme à +0,1 V/ECS et voltammogrammes réalisés entre -0,6 et +0,3 V/ECS en milieu M17.

Les voltammétries cycliques des essais « pil- » et « pil+ » ont la même forme générale. Quelle que soit la souche, une augmentation des densités de courant a été observée sur les 3-4 premiers jours de polarisation pour ensuite diminuer. Ces profils ont donc suivi parfaitement l'évolution du courant présentée en chronoampérométrie.

V.3.1.c) Milieu MCD

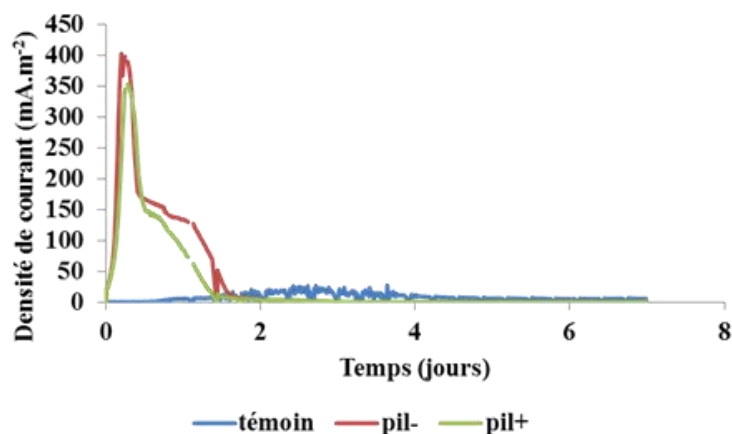


Figure V-84 : Chronoampérogramme à + 0,1 V/ECS en milieu MCD.

En milieu MCD, un pic de courant est produit rapidement après seulement 5 à 6 heures de polarisation (Figure V-84) avec un maximum de 350-400 mA.m⁻². Les densités de courant ont ensuite chuté brutalement à 150-200 mA.m⁻² après environ 12 heures. Le courant a continué de diminuer mais plus progressivement jusqu'à devenir nul en un peu moins de 2 jours.

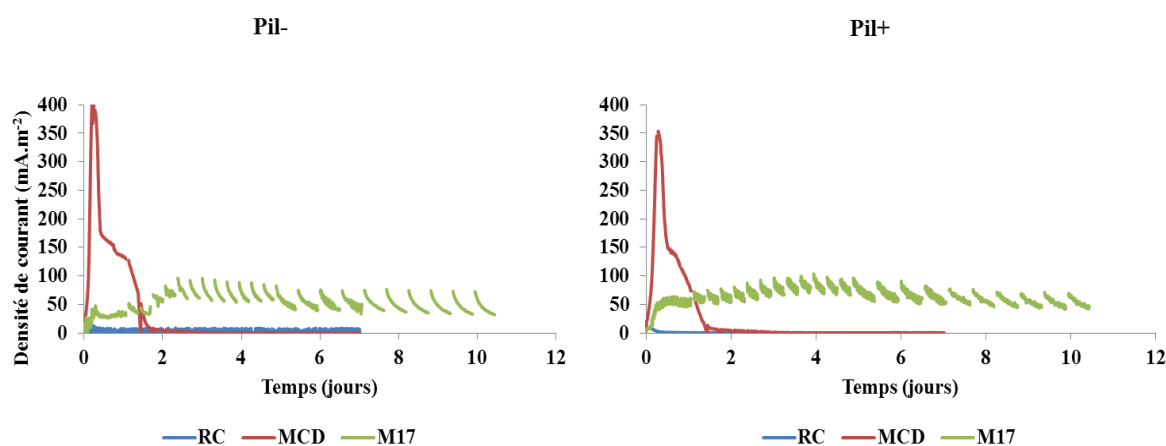
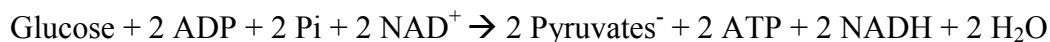


Figure V-85 : Chronoampérogrammes réalisés à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS dans trois milieux différents : « Resting cell » (en bleu), milieu MCD (en rouge) et milieu M17 (en vert). Les interruptions dans l'enregistrement du courant sont dues à la réalisation de voltammétries cycliques.

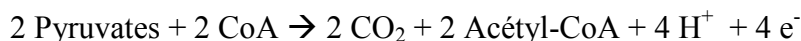
Les chronoampérogrammes obtenus ont les mêmes évolutions générales pour les souches « pil- » et « pil+ » (Figure V-85). En milieu RC, les densités de courant ont été faibles voire nulles. Avec le milieu M17, les densités de courant ont été plus élevées, environ 100 mA.m⁻² et ont atteint un courant stable toujours présent au bout de 10 jours d'expérimentation. Les densités de courant obtenues en milieu MCD ont formé un pic de courant atteignant 350 à 400 mA.m⁻² en quelques heures seulement puis le courant est devenu nul au bout de 2 jours.

Les densités de courant d'oxydation en milieu MCD ont été nettement plus élevées que celles obtenues en milieu RC et M17. Le milieu M17 est un milieu empirique qui contient des extraits de levure et de viande alors que le milieu MCD est un milieu synthétique dont la composition est maîtrisée. Il est possible que les cellules trouvent dans le milieu M17 des accepteurs d'électrons alternatifs en solution qui les détournent du transfert vers l'anode. Le milieu RC est sans doute trop pauvre pour permettre le fonctionnement métabolique des cellules. En conclusion, le milieu MCD a été choisi pour mener la suite de l'étude.

La catalyse de l'oxydation électrochimique du glucose par *Lactococcus lactis* est encore très peu traitée dans la bibliographie. La seule étude, à notre connaissance, qui a abordé cette réaction suppose que les électrons soient dirigés vers l'anode après les deux premières étapes de fermentation du glucose. La première étape, la glycolyse, transforme deux molécules d'ADP en ATP en oxydant le glucose en deux molécules de pyruvate grâce à la réduction de deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺/NADH) :



La deuxième étape transforme le pyruvate en acétyl-coenzymeA avec la réduction d'une molécule de NAD⁺ :



D'après Freguia et al. (2009) les cellules produisent un médiateur électrochimique extracellulaire, le 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone (ACNQ) qui assure l'oxydation intracellulaire des molécules de NADH en transférant les électrons à l'anode. En milieu MCD, bien que le biofilm ait commencé à se former avant le démarrage des expériences électrochimiques, les densités de courant démarrent à des valeurs proches de zéro pour ensuite atteindre leur maximum en à peine quelques heures. Cette augmentation du courant est trop rapide pour être imputée à la croissance du biofilm. L'évolution du courant traduit certainement la mise en régime du mécanisme de transfert d'électron vers l'électrode.

Le bilan global des deux premières étapes d'oxydation du glucose montre qu'une molécule de glucose consommée produit quatre molécules de NADH, donc l'oxydation en NAD⁺ produit un total de huit électrons :



Les rendements faradiques (R_f) sont calculés comme le rapport de la quantité d'électricité (Coulomb) obtenue par intégration du courant par rapport à la quantité théorique d'électrons disponibles dans le substrat oxydé.

$$R_f = (Q_E / Q_{\text{glucose}}) \times 100 \text{ avec}$$

Q_E : quantité d'électricité (mole e⁻) mesurée expérimentalement par l'intégration du courant I (A) par rapport au temps t (s). Ici, Q_E = 1,34.10⁻⁴ moles d'e⁻

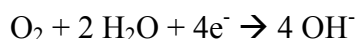
Q_{glucose} : quantité d'électricité (mole e⁻) théorique calculée par :

$$Q_{\text{glucose}} = C_{\text{glucose}} \times V_{\text{final}} \times n \text{ (nombre d'électrons générés par mole de combustible, ici 8 moles d'électrons par mole de glucose)} = 42.10^{-3} \times 500.10^{-3} \times 8 = 0,168 \text{ mole d'e}^-$$

$$\text{Ainsi } R_f = (1,34.10^{-4} / 0,168) \times 100 = 0,079 \%$$

Cela signifie que *Lactococcus lactis* dirige seulement 0,079 % de ces électrons vers l'anode et privilégie son métabolisme de fermentation et de croissance.

La voltammétrie cyclique effectuée au jour 1 (Figure V-86) montre clairement le signal d'oxydation présent à partir de + 0,1 V/ECS. Les voltammétries effectuées à partir du deuxième jour, alors qu'il n'y avait plus de courant d'oxydation en chronoampérométrie, ont confirmé l'absence du signal d'oxydation et ont détecté une réaction de réduction à partir de - 0,2 V/ECS qui semble être la réduction du dioxygène :



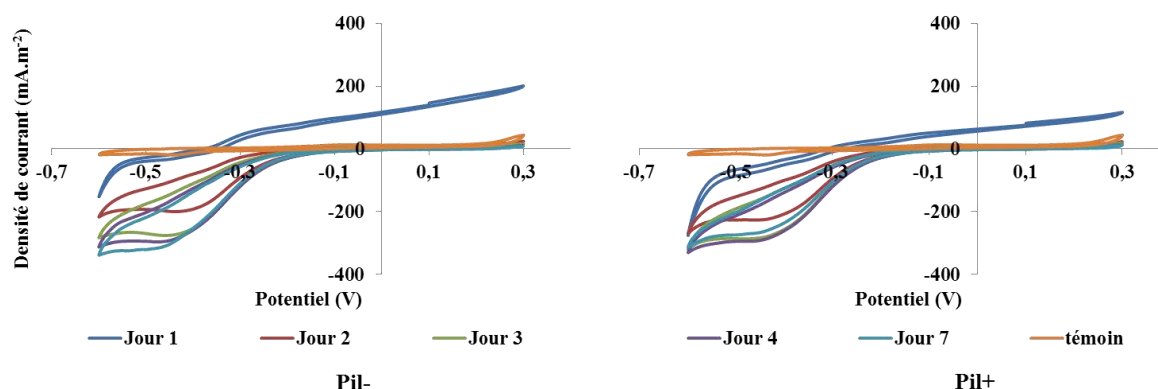


Figure V-86 : Voltammogrammes réalisés entre $-0,6$ et $+0,3$ V/ECS en milieu MCD.

L'implication du dioxygène a été confirmée par les voltammétries cycliques effectuées au jour 8 sous diazote (Figure V-87). Les 5 voltammétries effectuées successivement ont montré la perte progressive du signal de réduction (courbes azote 1 à 4) alors que le remplacement du barbotage de diazote par un barbotage d'air a entraîné la réapparition du signal de réduction.

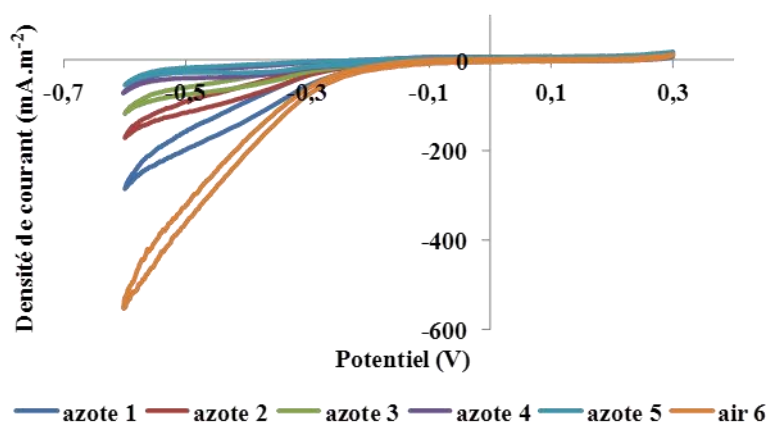


Figure V-87 : Voltammogrammes réalisés entre $-0,6$ et $+0,3$ V/ECS en milieu MCD sous barbotage de diazote (1 à 5) et d'air (6).

La réaction de réduction de dioxygène observée est bien catalysée par la présence de *Lactococcus lactis*. En effet, les voltammogrammes présentés en Figure V-88 n'ont pas montré de signal de réduction significatif sur l'électrode témoin, non colonisée alors qu'il est apparu clairement sur l'électrode colonisée par *Lactococcus lactis*.

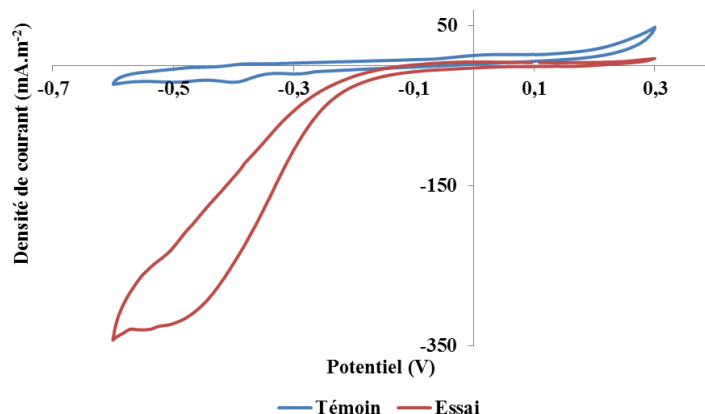


Figure V-88 : Voltammétries réalisées entre $-0,6$ et $+0,3$ V/ECS en milieu MCD au 4^{ème} jour d'expérimentation.

Une nouvelle expérience a été démarrée comme les précédentes mais, lorsque le courant d'oxydation commence à diminuer progressivement, le potentiel de polarisation a été modifié de + 0,1 V/ECS à - 0,3 V/ECS. Les voltammogrammes présentés précédemment indiquent que c'est à ce potentiel qu'un courant de réduction pourra être observé en chronoampérométrie.

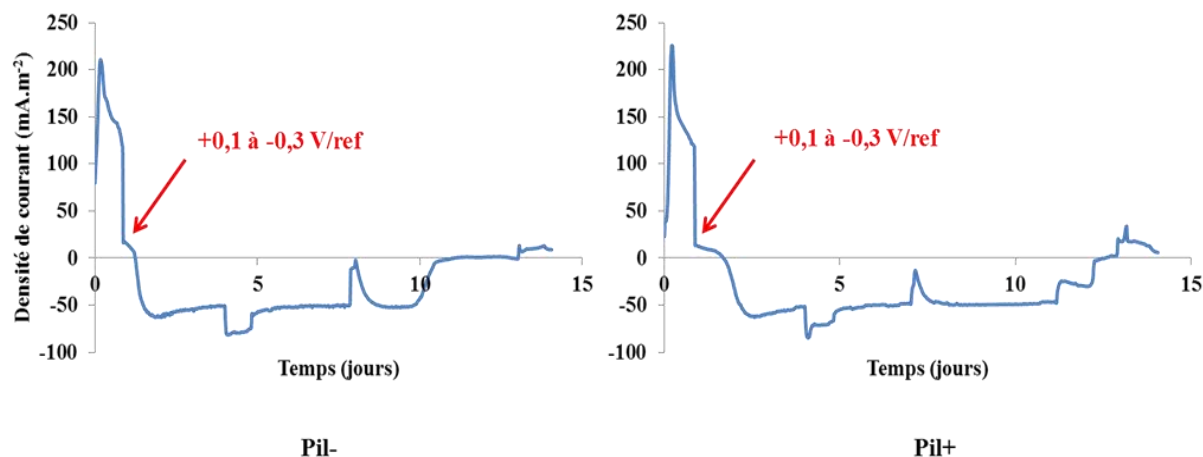


Figure V-89 : Chronoampérogrammes réalisés à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS puis - 0,3 V/ECS en milieu MCD.

Lorsque le potentiel imposé est de + 0,1 V/ECS, l'expérience se déroule de façon similaire aux expériences précédentes. Lorsque le potentiel est changé pour - 0,3 V/ECS, les densités de courant chutent brusquement mais ne passent pas en valeur négative, il n'y a donc pas de réaction de réduction (Figure V-89). Un temps de latence et d'adaptation est nécessaire avant que l'anode ne bascule en cathode. Le maximum de courant (en valeur négative) est atteint assez rapidement. Un peu plus de 50 mA.m⁻² sont obtenus en moins d'un jour. Puis, le courant se stabilise. Celui-ci peut augmenter jusqu'à environ 80 mA.m⁻² avec un barbotage d'air, comme on peut l'observer sur la figure avec le petit décrochement visible un peu avant le 5^{ème} jour d'expérimentation. Après l'arrêt du barbotage d'air le courant se stabilise de nouveau aux alentours de 50 mA.m⁻². Cet effet du barbotage d'air indique une réaction de réduction impliquant le dioxygène. Pour confirmer cette hypothèse, un barbotage de diazote est effectué. Celui-ci provoque l'arrêt de la production de courant. Dès que le barbotage de diazote cesse, le courant revient progressivement à environ 50 mA.m⁻² où il se stabilise jusqu'au 10^{ème} jour d'expérience pour la souche « pil- » et au 13^{ème} pour la souche « pil+ ».

C'est la première fois qu'une biocathode a été formée à partir d'un biofilm monoespèce de *Lactococcus lactis*.

V.3.2) Influence du pH et des pili sur les performances électrochimiques en milieu MCD

Les bactéries lactiques sont définies comme un groupe de bactéries à coloration de Gram positive, non mobiles, non sporulantes et possédant un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique...) (Orla-Jensen, 1919). Cette production d'acide lactique et autre acides organiques induit une acidification du milieu.

Le pH du milieu est soupçonné d'être le responsable de la chute brutale de courant observée lors des chronoampérométries réalisées en milieu MCD. Le suivi du pH tout au long de l'expérience le confirme. La chute rapide des densités de courant correspond parfaitement avec une forte baisse du pH de 6,8 à 4,2. Ensuite, le pH se stabilise à 4,2 (Figure V-90) et les performances électrochimiques continuent de chuter mais plus progressivement jusqu'à obtenir des densités de courant nulles au jour 3.

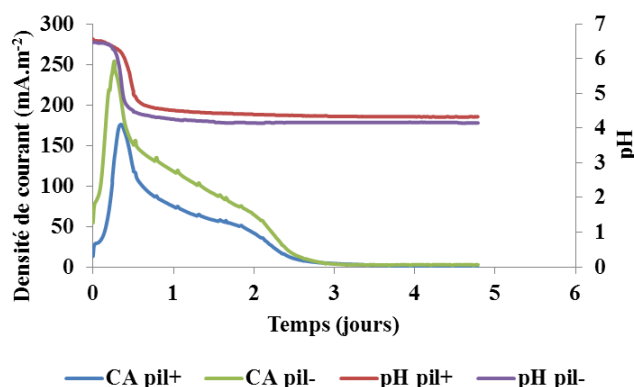


Figure V-90 : Chronoampérométries réalisées à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS en milieu MCD avec un suivi du pH.

La baisse de pH a certainement un impact fort sur le métabolisme de *Lactococcus lactis*. En effet, on peut supposer que durant les premières heures, les cellules mettent en œuvre une fermentation homolactique qui acidifie fortement le milieu. Une nouvelle expérience a été réalisée avec le milieu MDC en changeant la totalité du milieu réactionnel par du milieu « frais » après que le courant ait chuté mais avant qu'il ne soit retombé à zéro.

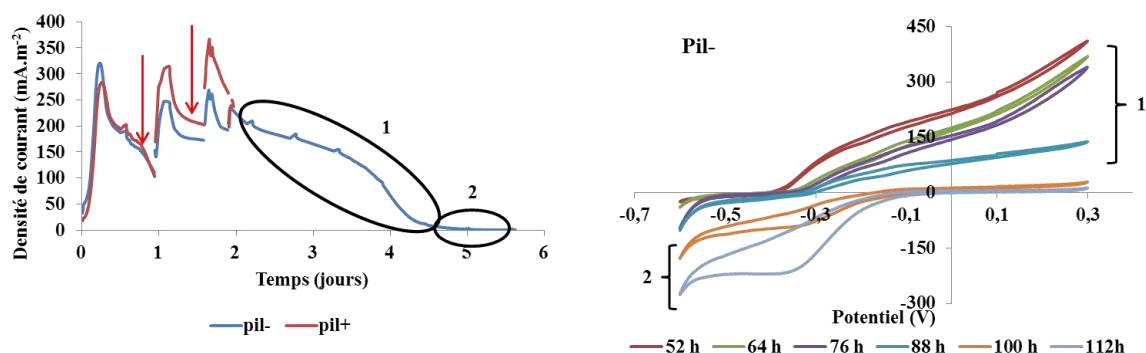


Figure V-91 : Chronoampérométries à + 0,1 V/ECS et voltammogrammes entre - 0,6 et + 0,3 V/ECS (1 mV/s) en milieu MCD. Les deux derniers pics apparaissent suite aux changements de milieu (indiqués par une flèche).

Les densités de courant maximales sont respectivement de 325 et 280 mA.m^{-2} pour les souches « pil- » et « pil+ » durant le premier batch (Figure V-91). Avant que la production de courant ne cesse, le milieu réactionnel est renouvelé. Pour la souche « pil- », le changement de milieu cause une perte de densité de courant d'environ 80 mA.m^{-2} , alors que pour la souche « pil+ » l'inverse se produit, les performances électrochimiques sont augmentées d'environ 50 mA.m^{-2} . La souche « pil+ » a été certainement moins perturbée par le détachement cellulaire du biofilm que la souche « pil- ». Un deuxième renouvellement de milieu a été effectué. Cette fois-ci, la souche « pil- » a été peu perturbée, ses performances restent à peu près au même niveau, tandis que la souche « pil+ » a amélioré sa performance d'environ 50 mA.m^{-2} .

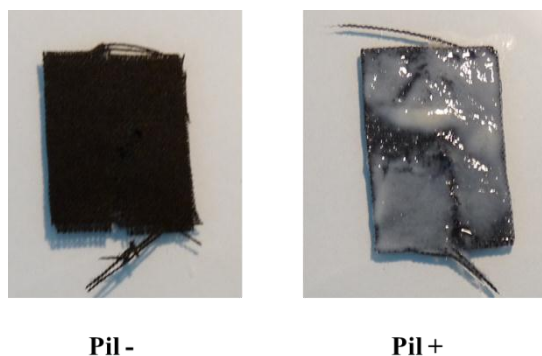


Figure V-92 : Photographies des électrodes en fin d'expérience.

Le changement de milieu a été bénéfique pour les deux souches certainement parce qu'il a remonté la valeur du pH et apporté de nouveaux nutriments. Cette opération a été plus bénéfique pour la souche « pil+ », qui a fourni un courant plus élevé que la souche « pil- ». En corollaire on a noté une plus forte densité cellulaire présente sur l'électrode comme le montrent les photographies des électrodes prises en fin d'expérimentation (Figure V-92). Généralement les biofilms formés par la souche « pil+ » sont légèrement plus importants que ceux de la souche « pil- ». Dans cette expérimentation la différence est beaucoup plus marquée. On peut penser que chaque renouvellement du milieu a provoqué un développement supplémentaire du biofilm pour les cellules « pil+ ». L'augmentation de la densité de courant qui en résulte suggère que les cellules, même éloignées de la surface de l'électrode, participent à la production et au transfert des électrons. Il est donc bénéfique de construire des biofilms relativement épais avec la souche « pil+ » pour favoriser le phénomène électrochimique. Toutefois, à la seule vue de la différence de colonisation entre les deux électrodes, il est clair que la densité de courant n'était pas proportionnelle à la densité cellulaire. Si un médiateur redox extracellulaire est impliqué dans le transfert d'électrons, comme supposé plus haut, l'épaisseur du biofilm de la souche « pil+ » peut être un frein à sa diffusion vers l'électrode. Il y a certainement un optimum à trouver dans la structure du biofilm pour maximiser l'efficacité du mécanisme électrochimique par rapport au métabolisme fermentaire.

Durant les 36 premières heures, les voltammogrammes ont suivi la baisse du courant constatée en chronoampérométrie, c'est l'étape 1. Ensuite, à partir de 100 heures, le signal de réduction du dioxygène a remplacé le signal d'oxydation, c'est l'étape 2. Ce signal de réduction s'amplifie jusqu'à 112 heures. La succession des étapes 1 et 2 souligne que les réactions d'oxydation du glucose et de réduction du dioxygène ne sont pas parallèles mais successives.

Lactococcus lactis est capable aussi bien d'oxydation que de réduction en surface de l'électrode. Par quel(s) mécanisme(s) le transfert d'électrons s'effectue-t-il ?

V.3.3) Recherche des mécanismes de transfert d'électrons

La réalisation de voltammétries cycliques avec différentes vitesses de balayage peut aider à identifier le type de mécanismes de transfert d'électrons mis en place par *Lactococcus lactis*. Lors d'un balayage de potentiel en oxydation, le courant croît lorsqu'un composé est oxydé à l'électrode puis il chute lorsque la concentration du composé décroît au voisinage de l'électrode. La voltammétrie présente donc un pic de courant dont l'intensité dépend de la concentration du composé et de la vitesse de balayage du potentiel. Lorsque le balayage de

potentiel est inversé, un phénomène symétrique est observé pour la réduction du composé produit lors du balayage précédent. Par conséquent, les voltammétries cycliques fournissent des informations sur le potentiel redox et les concentrations de(s) composé(s) qui prennent part aux réactions électrochimiques. La technique de voltammétrie à impulsion différentielle complète l'analyse de voltammétrie cyclique car elle permet d'amplifier les signaux révélant la présence du/des couple(s) redox impliqué(s) dans le transfert d'électrons. Ces techniques ont été mises en œuvre lorsque le courant est présent en chronoampérométrie.

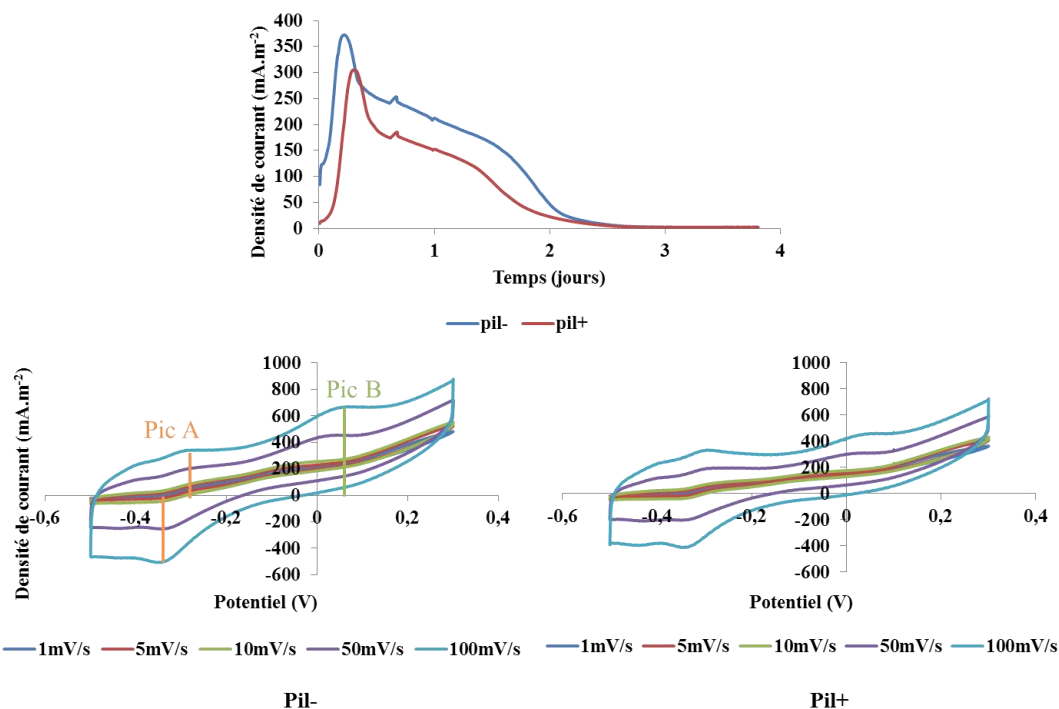


Figure V-93 : Chronoampérométrie à + 0,1 V/ECS et voltammogrammes réalisés entre - 0,6 et + 0,3 V/ECS et à différentes vitesses de balayage en milieu MCD à la 18^{ème} heure.

Les voltammétries cycliques effectuées à 1, 5, 10, 50 et 100 mV/s ont été réalisées simultanément pour les deux souches un peu avant le jour 1 au niveau du décrochement visible sur le chronoampérogramme.

Les profils de voltammétries sont identiques pour les deux souches (Figure V-93). Les vitesses de balayage de 50 et 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ont donné des pics de courant mieux différenciés. Deux pics ont été observés en oxydation indiquant la présence de deux systèmes redox. Le couple redox 1 (pic A) a un potentiel médian $(\Delta E_1 + \Delta E_2)/2$ de - 0,33 V/ECS. Le potentiel du second couple redox (pic B) est difficile à déterminer car le pic correspondant en réduction n'est pas visible.

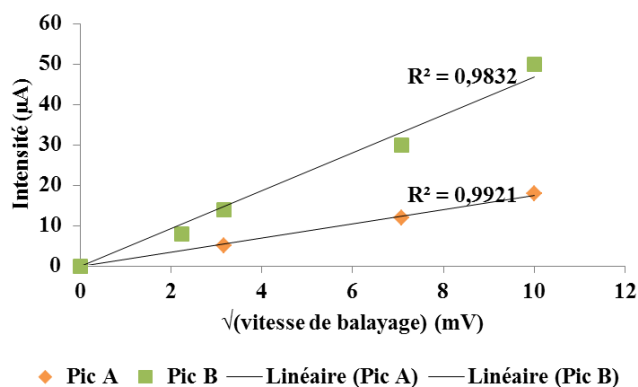


Figure V-94 : Tracés représentant l'intensité (courant capacitif) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage réalisés à partir des deux pics observés en Figure V-91.

L'intensité des deux pics de courant visibles en oxydation est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage ($R^2 = 0,9921$ et $0,9832$) (Figure V-94). Ce comportement révèle un transfert électronique limité par la diffusion des espèces vers celle-ci. Le mécanisme de transfert d'électrons est donc un mécanisme indirect impliquant des médiateurs synthétisés par *Lactococcus lactis*.

Des voltammétries ont également été tracées alors que plus aucun courant n'est produit en chronoampérométrie (phase 2) afin de caractériser les biofilms en l'absence de la réaction d'oxydation du glucose.

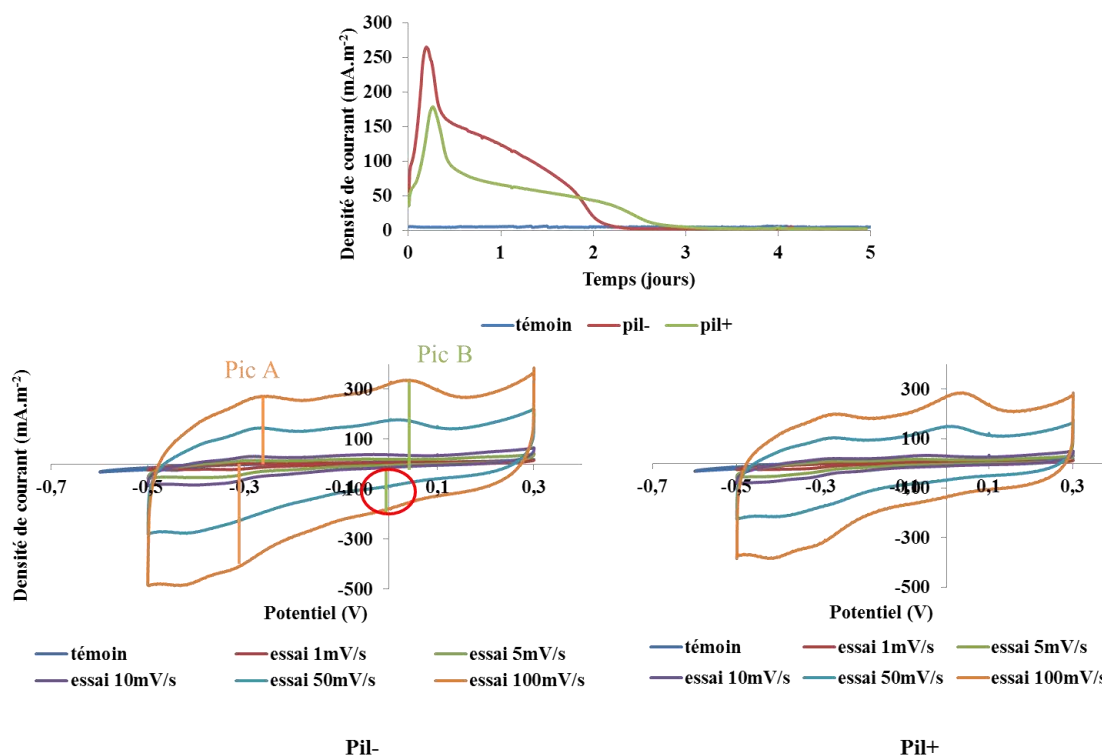


Figure V-95 : Chronoampérogrammes à + 0,1 V/ECS et voltammogrammes réalisés entre - 0,6 et + 0,3 V/ECS et à différentes vitesses de balayage en milieu MCD lorsque plus aucun signal d'oxydation n'est visible en chronoampérométrie.

Les profils de voltammétries sont similaires pour les deux souches et sont semblables aux profils obtenus précédemment. (Figure V-95). Toutefois, un pic en réduction est visible pour le second système (pic B) et il est donc possible d'en déterminer le potentiel redox, de l'ordre de + 0,025 V/ECS. Sur les voltammétries précédentes, tracées alors qu'il y avait encore un phénomène d'oxydation en chronoampérométrie, ce pic de réduction (entouré en rouge sur la figure) n'était pas visible probablement parce que le composé était réduit par un substrat présent en solution avant que le balayage de potentiel en sens inverse ne puisse le détecter. En d'autres termes, le composé est oxydé par électrochimie (d'où le pic d'oxydation) puis rapidement réduit par la cellule si bien qu'il ne peut plus être détecté lors du balayage retour. Ceci tendrait à prouver que ce système redox est impliqué dans l'oxydation du substrat.

Toutefois, les voltammétries présentent des signaux difficiles à distinguer. Des analyses en voltammétrie à impulsion différentielle (DPV) ont alors été effectuées afin de faire ressortir les signaux dus à la présence des différents médiateurs. Dans la Figure V-96, le diagramme du haut présente les DPV réalisées pendant l'oxydation du glucose et celui du bas ceux tracés pendant la réduction du dioxygène.

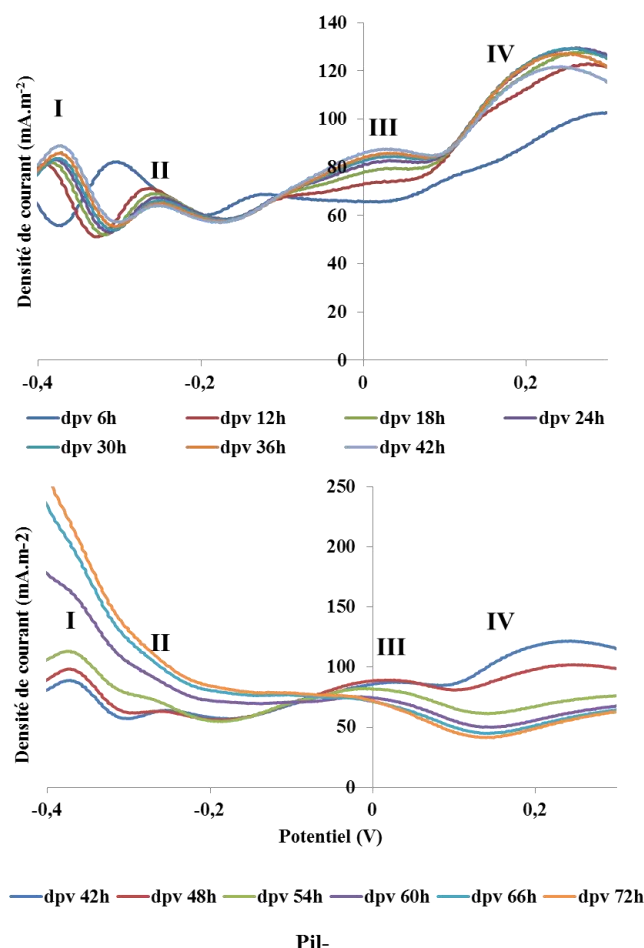


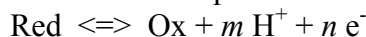
Figure V-96 : Voltammogrammes à impulsion différentielle effectués toute les 6 heures en milieu MCD.

Les courbes obtenues en DPV ont révélé quatre pics de courant. Le pic II, à un potentiel légèrement supérieur à - 0,3 V/ECS, correspond au pic d'oxydation A observé en voltammétrie cyclique. Dans cette zone de potentiel, la DPV révèle un second pic à un

potentiel inférieur (pic I) qui pouvait à peine être deviné sur les voltammétries. Le pic III vers un potentiel de + 0,05 V/ECS correspond au pic B de voltammétrie cyclique, par contre le pic IV n'était absolument pas visible en voltammétrie.

Parmi ces quatre pics, deux au moins étaient pH dépendants. En effet, une différence de profil très marquée a lieu entre les DPV réalisées à 6 et 12 heures, moments où est survenue la forte chute de pH. La DPV ne commençant qu'à - 0,4 V/ECS, on n'est pas certain que le pic I se soit déplacé avec l'acidification du pH. Lorsque le pH varie de 6,3 à 4,2, les potentiels redox passent de - 310 à - 250 mV pour le pic II et de - 105 à + 5 mV pour le pic III soit des variations de 29 et 52 mV par unité pH.

La variation du potentiel redox d'un système électrochimique :



en fonction des conditions du milieu est régie par la loi de Nernst, dont on peut tirer l'évolution du potentiel apparent du système ($E^{0'}$) en fonction du pH :

$$E^{0'} = E^0 - \frac{2,3RT}{F} \cdot \frac{m}{n} \text{pH avec : } E^{0'} : \text{potentiel apparent}$$

E^0 : potentiel standard d'équilibre

R : constante de gaz ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T : température (Kelvin)

F : constante de Faraday (96 485 C/mole d'électrons)

m : nombre de protons échangés

n : nombre d'électrons échangés

soit dans la condition standard de température et de pression :

$$E^{0'} = E^0 - 0.059 \cdot \frac{m}{n} \text{pH}$$

Soit une variation de 59 mV par unité de pH lorsque autant de protons que d'électrons sont échangés ($m = n$). Une variation de l'ordre de 30 mV par unité de pH correspond donc à un système redox qui échange deux électrons mais un seul proton, comme par exemple NAD^+/NADH :



Toutefois le potentiel redox du système révélé par le pic II en DPV a un potentiel redox évalué à - 0,33 V/ECS à partir des voltammétries cycliques, alors que le potentiel du couple NAD^+/NADH est de - 0,56 V/ECS à pH 7,0, soit de - 0,47 V/ECS à pH 4,0. Le pic II correspond donc à un système qui échange un proton et deux électrons mais il ne peut pas être attribué au couple NAD^+/NADH .

V.3.3.a) Modèle de transfert d'électrons lors de l'oxydation du glucose par *Lactococcus lactis*

Certaines conditions de fermentation, comme l'aérobiose, (Condon, 1987) induisent un basculement de la voie fermentaire, la production de lactate est inhibée et un métabolisme mixte se met en place. Au cours du métabolisme mixte, le glucose qui emprunte la voie de glycolyse continue à générer du pyruvate, mais le pyruvate est alors métabolisé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) (aérobiose) en acétyl-CoA puis en acétate. Cet enchainement de réactions d'oxydation produit quatre NADH. Il y a donc une augmentation du ratio NADH/NAD^+ . Un des moyens de ré-oxyder le NADH consiste à transférer les électrons à l'anode qui sert alors d'accepteur final d'électrons grâce à l'implication d'un médiateur soluble.

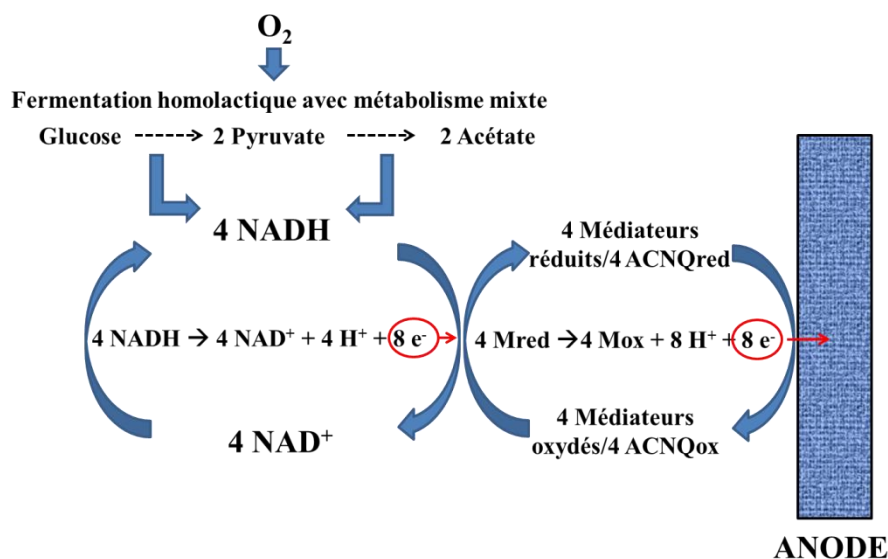


Figure V-97 : Modèle de transfert d'électrons lors de l'oxydation du glucose par *Lactococcus lactis*

V.3.3.b) Modèle de transfert d'électrons lors de la réduction du dioxygène par *Lactococcus lactis*

Lors du changement de potentiel à $-0,3$ V/ECS, l'ACNQ pourrait également être impliquée dans le transfert d'électrons de la cathode vers la cellule bactérienne en association à des enzymes capables de réduire le dioxygène. En effet, *Lactococcus lactis* possède des enzymes de défense contre le stress oxydant, telles que les NADH oxydases, qui réduisent le dioxygène en eau tout en régénérant le NAD^+ . La Figure V-98 propose un modèle de cathode impliquant les NADH oxydases ainsi que l'ACNQ ou autre médiateur soluble.

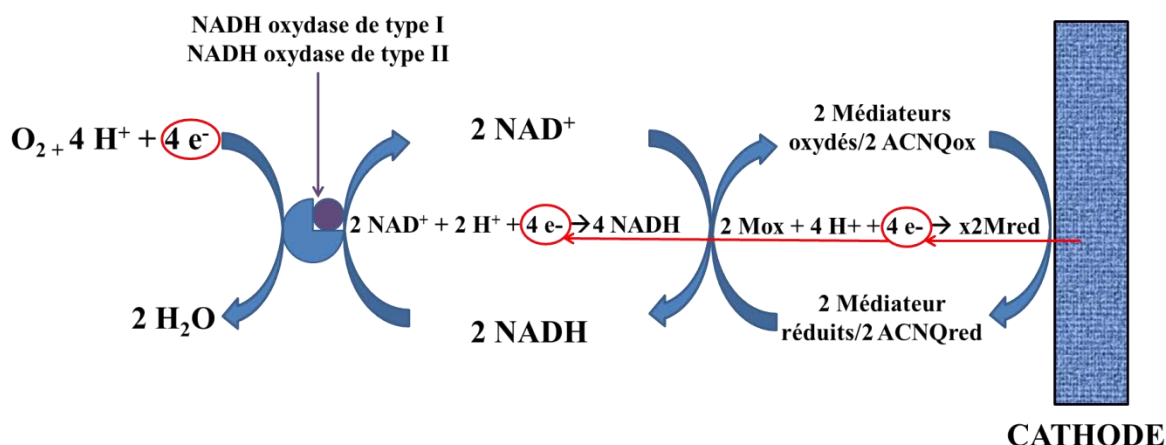


Figure V-98 : Modèle de transfert d'électrons lors de la réduction du dioxygène par *Lactococcus lactis*.

V.4) Conclusions sur le chapitre et perspectives

Les transformations effectuées sur les deux souches de *Lactococcus lactis* « pil – » et « pil + » ont fonctionné. En effet, les cellules transformées ont acquis un des plasmides porteurs de la *gfp*. Toutefois, la fluorescence de la Gfp n'est pas homogène au sein des biofilms formés par les souches transformées. Certaines cellules ne fluorescent pas et nous n'avons pas pu déterminer la cause de ce phénomène. De plus, l'intégration d'un second plasmide par les souches « pil + » semble avoir modifié la structure du biofilm formés par celles-ci. En effet, les biofilms formés par les souches « pil + » transformées sont moins épais et paraissent plus compacts que les biofilms formés avant leur transformation.

Les tests de colonisation ont également permis de révéler que, parmi toutes les conditions testées : ajout d'un tampon MOPS, ajout d'hémine ou encore augmentation de la conductivité par des concentrations croissantes en NaCl ; c'est la condition standard de culture de *Lactococcus lactis* qui permet l'obtention du biofilm le plus épais, le plus aéré et contenant un fort biovolume. Ce type de biofilm est recherché car nous pensons qu'il permet d'obtenir de meilleures performances électrochimiques. Un biofilm épais présentant un fort biovolume signifie qu'il y a plus de cellules susceptibles d'échanger des électrons avec l'électrode.

Les propriétés électroactives de *Lactococcus lactis* avaient été prouvées en 2009 lors de la détection d'un courant d'oxydation sur une électrode de carbone plongée dans une suspension de cellules de *Lactococcus lactis*. La suspension cellulaire avait été réalisée dans un milieu principalement composé de tampon phosphate. Ce milieu n'est pas un milieu de culture puisqu'il ne permet pas la croissance bactérienne. Il permet juste le maintien des activités catalytiques/enzymatiques dans et en dehors des cellules. Ce milieu est classiquement appelé milieu « resting cells ». La plus haute densité de courant obtenue lors de cette étude était d'environ 30 mA.m⁻² avec une électrode polarisée à + 0,1 V/ESH (soit – 0,14 V/ECS).

Dans nos travaux, nous avons pu identifier un milieu qui permet d'atteindre des densités de courant plus conséquentes. Le milieu qui a permis d'obtenir les meilleures performances électrochimiques est le milieu MCD. Sur une électrode de tissu de carbone polarisée à + 0,1 V/ECS, les densités de courant ont atteint 400 mA.m⁻² soit 13 fois plus que dans l'étude menée par Freguia et al., (2009). L'utilisation de ce milieu est également intéressante d'un point de vue pratique. En effet, la production de courant (i.e. la réponse électrochimique) est très rapide mais n'excède pas 48 heures. Cette durée d'expérience, très courte par rapport aux 10, 20 et même parfois plus de 30 jours d'expérience que nous avons l'habitude de pratiquer, est vraiment appréciable pour multiplier et reproduire les expériences. Cet arrêt de la production de courant est certainement dû à l'acidification du milieu causée par la production d'acide lactique lors de l'oxydation du glucose.

Ce même milieu MCD a également permis de mettre en évidence pour la 1^{ère} fois la catalyse de la réduction du dioxygène par *Lactococcus lactis* sur une électrode de carbone. C'est donc, parmi la littérature sur les biocathodes à oxygène, la première cathode réalisée à partir d'un biofilm de *Lactococcus lactis*.

Le mécanisme de transfert d'électrons, déterminé lors de la réaction de réduction, s'est révélé être un transfert de type indirect impliquant des médiateurs électrochimiques. L'un de ces médiateurs a potentiellement été identifié comme une quinone, l'ACNQ. Des modèles de mécanismes anodiques et cathodiques faisant intervenir ce médiateur soluble ont été proposés.

Afin d'optimiser encore les performances et éviter le problème d'acidification du milieu rencontré en batch, il serait pertinent de réaliser une biocathode dans un réacteur électrochimique alimenté en continu avec du milieu MCD. En effet, nous avons pu démontrer

que le renouvellement du milieu avait un effet bénéfique sur les performances électrochimiques et sur la colonisation de la surface de l'électrode, surtout pour la souche « pil + ». La souche génétiquement modifiée, capable de produire des pili, offrirait l'avantage indéniable de former des biofilms robustes sur les électrodes susceptibles de résister au stress hydrodynamique dans un procédé continu.

Conclusion générale

Perspectives

Les travaux présentés dans cette étude sont basés sur un phénomène peu étudié de transfert d'électrons de l'électrode vers la bactérie. Les biocathodes sont bien moins étudiées que les bioanodes. Ainsi, les mécanismes de transfert impliqués dans les réactions de réduction cathodiques sont moins connus que ceux pouvant être impliqués dans l'oxydation anodique. Toutefois, l'étude des mécanismes de transfert électronique à la biocathode, nécessite la formation de biofilms monospèces et la maîtrise parfaite des paramètres expérimentaux des expériences bioélectrochimiques.

L'objectif premier de cette étude était la formation de biofilms électroactifs monospèces catalysant une réaction de réduction du dioxygène dans des conditions expérimentales contrôlées. Le Laboratoire de Génie Chimique était déjà en possession d'une souche bactérienne électroactive isolée à partir d'un biofilm marin, *Algoriphagus yeomjeoni*. Cette souche a été notre souche modèle de départ. Un milieu synthétique dont on maîtrise la composition, contrairement à l'eau de mer naturelle habituellement utilisée, a été mis au point. Les réacteurs bioélectrochimiques utilisés pour l'étude des propriétés électroactives contiennent donc de l'eau de mer synthétique supplémentée en vitamines et en micronutriments. Toutefois, aucun courant cathodique n'a pu être observé dans un tel milieu synthétique ni en eau de mer naturelle avec un potentiel de $-0,2$ V/ECS.

La perte de la souche modèle *Algoriphagus yeomjeoni* a été le déclencheur pour mener une nouvelle campagne d'isolement de microorganismes marins pouvant former des biocathodes réduisant le dioxygène. A partir des biofilms cathodiques formés au CNR ISMAR (Gênes, Italie) ont pu être isolées quatre souches hétérotrophes. Ces souches appartiennent au genre *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Marinobacter* et *Roseobacter*. Ces quatre souches ont présenté des propriétés électroactives en eau de mer naturelle et en eau de mer synthétique. C'est la première fois, que des biocathodes réduisant le dioxygène ont été formées à partir de biofilms marins monospèces en eau de mer synthétique. Les courants de réduction ont été obtenus avec un potentiel fixe de $-0,3$ V/ECS. Lorsque l'on a testé ce potentiel avec la souche *Algoriphagus yeomjeoni*, un courant électrique est détecté aussi bien en eau de mer naturelle qu'en eau de mer synthétique. Donc, bien que les biofilms marins électroactifs aient été formés sous un potentiel de $-0,2$ V/ECS, il faut appliquer un potentiel légèrement inférieur de $-0,3$ V/ECS pour voir apparaître un courant de réduction dans nos bioréacteurs en batch.

Les courants obtenus avec les souches marines sont restés faibles et les expériences présentent un manque de reproductibilité. Pour optimiser le procédé de biocathodes réduisant le dioxygène par le développement d'un biofilm marin monospèce, deux points devraient être étudiés plus en avant :

- une méthode d'enrichissement du biofilm car l'expérience ayant lieu dans un milieu pauvre en nutriments celui-ci ne permet donc pas (ou peu) la croissance des microorganismes. Par exemple un système d'alternance entre un milieu riche pour favoriser la maturation du biofilm présent sur l'électrode et des passages en réacteurs bioélectrochimiques en eau de mer synthétique pourrait être mis en place.
- optimiser la colonisation des électrodes. Lors de cette présente étude nous avons pu constater l'effet bénéfique d'un traitement de surface de l'acier inoxydable à la poly-L-lysine. Cependant des progrès peuvent encore être réalisés en couplant l'effet de plusieurs traitements de surface.

Une autre solution pour optimiser les biocathodes est de travailler avec des microorganismes capables de réduire le dioxygène et d'accepter les électrons provenant de l'électrode en milieu riche, et génétiquement modifiés afin d'optimiser la colonisation de l'électrode. C'est ce qui a été réalisé avec la souche *Lactococcus lactis*. Les premières expérimentations électrochimiques avec *Lactococcus lactis* se sont d'abord déroulées dans un contexte anodique et surtout dans un environnement aérobie. En milieu MCD, *Lactococcus lactis* est capable de fournir des densités de courant maximales de l'ordre de 300 mA.m^{-2} lorsque le potentiel appliqué est de $+ 0,1 \text{ V/ECS}$, ce qui est la meilleure performance électrochimique à ce jour avec cette souche. L'aérobie du milieu est crucial pour l'obtention d'une biocathode réduisant le dioxygène. Une biocathode où la réduction du dioxygène est catalysée par *Lactococcus lactis* a été obtenue pour la première fois. Les courants cathodiques obtenus étaient de l'ordre de $- 50 \text{ mA.m}^{-2}$ en milieu MCD et avec un potentiel à $- 0,3 \text{ V/ECS}$. Cette biocathode nouvellement formée peut être améliorée. Par exemple, un procédé en continu serait une solution à l'acidification observée dans les bioréacteurs en batch. Les performances cathodiques pourraient être augmentées en trouvant la concentration en dioxygène dissous optimale pour la réduction du dioxygène non préjudiciable aux cellules de *Lactococcus lactis*. *Lactococcus lactis* est en effet un microorganisme microaérophile et non un microorganisme aérobie.

Les mécanismes de transfert d'électrons mis en place lors de la catalyse de la réduction du dioxygène par les microorganismes impliqueraient les pigments des bactéries marines. Ces composés sont effectivement des alliés des microorganismes marins qui font parfois face à des stress (photo)oxydants. Dans le cas de *Lactococcus lactis*, le mécanisme de transfert d'électrons semble être un mécanisme de transfert indirect, faisant appel à des médiateurs électrochimiques. Quatre systèmes redox ont pu être clairement définis. Certains de ces systèmes sont pH dépendant comme constaté lors de la chute du pH observée dans les bioréacteurs. Ces composés pH dépendants font penser à des médiateurs de types quinones. L'ACNQ, une quinone produite par *Lactococcus lactis*, a déjà été identifiée comme médiateur électrochimique dans la bibliographie sur les propriétés électrochimiques de *Lactococcus lactis*. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes de transfert d'électrons, des techniques de biologies moléculaires peuvent être envisagées. En effet, *Lactococcus lactis* est un microorganisme beaucoup étudié et manipulé génétiquement. La réalisation de souches mutantes délétées ou surexprimant des gènes codants pour certaines quinones serait un moyen d'observer l'impact de ces composés sur la production de courant. Ainsi, leur implication dans le transfert d'électrons entre les cellules et l'électrode pourra être déterminée.

Table des illustrations

Liste des figures

Figure I-1 : Biofilms de (A) <i>Shewanella oneidensis</i> sur une surface en verre (Thormann et al., 2004) ; (B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à l'interface air/liquide (Bartlett et al., 2011) et un floc de boue activée (C) (Weissbrodt et al., 2013).	9
Figure I-2 : Représentation schématique du cycle de vie d'un biofilm.	10
Figure I-3 : Flagelle (A) et pili (B) de <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> .	10
Figure I-4 : Biofilms électroactifs marins adapté de (Lovley, 2006).	12
Figure I-5 : Microorganismes électroactifs en surface des électrodes. (Source LGC).	13
Figure I-6 : Représentation schématique d'une réaction anodique dont le transfert d'électron est réalisé par un produit du métabolisme cellulaire (ici, l'hydrogène) (Lovley, 2006).	13
Figure I-7 : Représentation schématique d'une réaction anodique dont le transfert électronique est réalisé par un médiateur électrochimique artificiel ou exogène (Lovley, 2006).	14
Figure I-8 : Formules semi-développées des molécules de (A) riboflavine, (B) pyocyanine et (C) ACNQ.	15
Figure I-9 : Représentation schématique d'une PCM dont le transfert d'électrons est directement assuré par une protéine membranaire (Lovley, 2006).	15
Figure I-10 : Modèle du transfert d'électrons chez <i>Geobacter sulfurreducens</i> par (A) les cytochromes de type c membranaires et (B) les pili conducteurs (Yang et al. 2012).	16
Figure I-11 : Réponse ohmique du pilus de <i>Geobacter sulfurreducens</i> obtenue avec l'aide d'un microscope à force atomique (Reguera et al., 2005).	16
Figure I-12 : (A) Pili connectant des cellules bactériennes de <i>Shewanella oneidensis</i> entre elles (MEB) (Gorby et al., 2006); (B) Représentation schématique des transferts d'électrons chez <i>Geobacter sulfurreducens</i> (Franks & Nevin, 2010).	17
Figure I-13 : Nombres de publications par années concernant les bioanodes vs biocathodes.	23
Figure I-14 : Principe de base de l'électrosynthèse microbienne (Wang & Ren, 2013).	25
Figure I-15 : Tableau des potentiels redox de couple (à pH 7 ; * à pH 7,2 ; ** à pH 2)	26
Figure I-16 : Solubilité de l'oxygène dans l'eau en fonction sa température et de sa salinité.	34
Figure I-17 : Représentation schématique des possibles mécanismes pouvant expliquer la réduction du dioxygène par les microorganismes à la surface d'une électrode.	35
Figure I-18 : Représentation schématique du dépôt et de la ré-oxydation du manganèse utilisé comme réaction cathodique (Rhoads et al., 2005).	36
Figure I-19 : Mécanismes proposé pour la décomposition de peroxyde d'hydrogène sur des oxydes de fer Fe(III) (Lin & Gurol, 1998).	37
Figure I-20 : Transfert direct d'électrons impliquant les cytochromes c (gauche) et un partenariat cytochromes-hydrogénases (droite) (Rosenbaum et al., 2011).	38
Figure I-21 : Images de microscopie en épifluorescence d'un biofilm de <i>Geobacter sulfurreducens</i> sur acier non polarisé (image de gauche) ou polarisé à -0,6 V/Ag-AgCl	39
Figure I-22 : Structure 3D d'un biofilm anodique formé sur une électrode en acier inoxydable après 18 jours de polarisation à - 0,1 V/ECS.	39

Figure I-23 : Evolution du courant obtenu en réacteur continu inoculé avec 10 mL de biofilm et alimenté en eau de mer naturelle à partir du 2 ^{ème} jour.....	40
Figure I-24: ADNr 16S et ARNr 16S.....	41
Figure I-25 : Représentation des phyla bactériens en milieu marin.....	42
Figure I-26 : Diagramme des 20 phylotypes bactériens les plus abondants obtenus par pyroséquençage dans l’océan (projet ICoMM).....	43
Figure I-27: Représentation schématique du métabolisme homofermentaire comprenant la glycolyse suivie des voies des métabolismes homolactique et mixte.....	46
Figure I-28 : Schéma représentant la paroi des bactéries à coloration de Gram positive	48
Figure I-29 : Mécanisme de transfert d'électrons entre <i>L. lactis</i> et l'anode polarisée	51
Figure II-30: Représentation schématique (à gauche) et illustration photographique (à droite) des réacteurs bioélectrochimiques à trois électrodes.....	55
Figure II-31 : Représentation schématique d’une électrode de référence au calomel saturée. 56	
Figure II-32 : (A) Electrode de travail en tissu de carbone ; (B) électrode de travail en acier inoxydable 254SMO et (C) contre électrode en platine.....	56
Figure II-33 : Représentation schématique du dispositif de chronoampérométrie.....	58
Figure II-34 : Exemple d’un voltammogramme cyclique, vitesse de balayage de 0,1 V.s ⁻¹	59
Figure II-35 : Représentation schématique de la forme d’onde imposée du potentiel en voltammétrie à impulsion différentielle.....	60
Figure II-36 : Comparaisons des résultats entre voltammétrie linéaire (trait pointillé) et voltammétrie à impulsion différentielle (trait plein).....	60
Figure II-37 : Schématisation du protocole de transformation d’ <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	65
Figure II-38 : Dispositif expérimental servant à étudier la colonisation d’ <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> sur des coupons en acier inoxydable.....	66
Figure II-39 : Vue d’ensemble du dispositif expérimental	68
Figure II-40 : Montage utilisé pour la polarisation simultanée de plusieurs échantillons d’acier inoxydable.....	69
Figure III-41 : Démarche originale d’isolement de bactéries marines.....	81
Figure III-42 : Chronoampérogramme d’un biofilm marin formé sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à – 0,2 V/ECS et isolement et identification de la souche <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> (Erable, données non publiées).....	82
Figure III-43 : Evolution du courant au cours du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO lors de la formation d’un biofilm d’ <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> en eau de mer naturelle et sous un potentiel de - 0,2 V/ECS (données non publiées, Benjamin Erable).....	82
Figure III-44 : Structure de la fléxixanthine.....	84
Figure III-45 : Suivi de croissance d’ <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> par mesure de la densité optique en milieu Marine Broth à 25,30 et 37°C et sous une agitation de 150 rpm.	85

Figure III-46 : Suivi de croissance d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> par mesure de la densité optique en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines (bleu) ainsi qu'en glucose (1 g.L ⁻¹) (rouge) ou en acétate (1 g.L ⁻¹) (vert) à 30°C et sous une agitation de 150 rpm.	86
Figure III-47 : Balayage spectral (300 < λ < 700) d'une solution d'acétone contenant les caroténoïdes produits par <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	87
Figure III-48 : Influence de la lumière sur la croissance d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> et sur la production de caroténoïdes en milieu Marine Broth, à 30° et sous une agitation de 150 rpm.	88
Figure III-49 : Influence de l'aération sur la croissance d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> et sur sa production de caroténoïdes en milieu Marine Broth, à 30°C.	89
Figure III-50 : <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> transformés et isolés sur milieu gélosé Marine Agar supplémenté en ampicilline à 100 µg.mL ⁻¹ après électroporation.	91
Figure III-51 : Observation en microscopie en épifluorescence de la surface de coupons en acier inoxydable exposés 24 heures à une culture d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> contenant le plasmide pAS43 (A) et après marquage à l'acridine orange (B) en milieu Marine Broth dilué au 1/3.	91
Figure III-52 : Coupons d'acier inoxydable placés dans le dispositif expérimental. Les coupons ont été disposés dans une anfractuosité prévue à cet effet et dans l'alignement du flux hydrodynamique créé par la pompe péristaltique.	92
Figure III-53 : Cinétique de colonisation d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> sur de l'acier inoxydable 254SMO ayant subi ou non un traitement mécanique (microstructuration de 1µm) ou chimique (« coating » de poly-L-lysine ou de glucose) sur 24 heures en milieu Marine Broth dilué 1/3.	93
Figure III-54 : Cinétique de colonisation d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> sur de l'acier inoxydable 254SMO ayant subi ou non un traitement mécanique (microstructuration 1µm) ou chimique (« coating » de poly-L-lysine ou de glucose) sur 24 heures en eau de mer synthétique.	95
Figure III-55 : Voltammogramme sur acier inoxydable 254SMO avec un balayage du potentiel entre - 0,7 et + 0,3V/ECS.	98
Figure III-56 : Evolution du courant en fonction du temps sur une électrode de 25 cm ² en acier inoxydable polarisée à -0,2V/ECS et immergée en eau de mer synthétique supplémentée en vitamines et micronutriments.	100
Figure III-57 : Evolution du courant de réduction sur une électrode en acier inoxydable « propre » polarisée à - 0,2V/ECS (sans biofilm) puis sur une électrode en acier inoxydable polarisée à - 0,2V/ECS déjà colonisée par un biofilm d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> (�� partir du 15 ^{ème} jour).	101
Figure III-58 : Evolution du courant de réduction sur acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,2V/ECS colonisée par un biofilm d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> sous un bullage de diazote entre le 6 ^{ème} et 7 ^{ème} jour.	101
Figure IV-59 : Evolution de la densité de courant (valeur absolue), correspondant à la réduction de l'oxygène, sur une électrode en acier inoxydable polarisée à - 0,2 V/Ag-AgCl et exposée dans un système alimentée continuellement en eau de mer.	107
Figure IV-60 : Représentation schématique de la démarche conduisant à l'isolement de souches modèles capables de catalyser la réduction de l'oxygène et à l'analyse de la diversité des populations bactériennes.	108

Figure IV-61 : Histogrammes représentant les proportions des phylums, classes et genres du biofilm marin aérobique. (% au sein du biofilm « sauvage »)	109
Figure IV-62 : Quatre souches isolées à partir du biofilm marin aérobique.	112
Figure IV-63 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,2 V/ECS, préalablement mise en contact avec une culture bactérienne de <i>Roseobacter</i> ; en eau de mer naturelle et une agitation de 300 rpm. .	115
Figure IV-64 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,2 V/ECS puis à - 0,3 V/ECS au 14 ^{ème} jour d'expérimentation, préalablement mise en contact on non (Témoin) avec une culture bactérienne de <i>Bacillus</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Roseobacter</i> ou <i>Pseudoalteromonas</i> ; en eau de mer naturelle et sous une agitation de 300 rpm.	117
Figure IV-65: Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO, zoom sur l'effet de l'arrêt de l'agitation de 300 rpm et d'une injection d'air (uniquement pour le test concernant <i>Pseudoalteromonas</i>).....	118
Figure IV-66 : Effet de l'agitation sur la catalyse de la réduction du dioxygène par <i>Bacillus</i> , <i>Marinobacter</i> et <i>Roseobacter</i> (en rouge linéaire : sans agitation ; en rouge pointillé : avec agitation) sur acier inoxydable comparé à un réacteur témoin (non inoculé) sous agitation (en bleu).....	119
Figure IV-67: Effet de l'agitation (en rouge linéaire : sans agitation ; en rouge pointillé : avec agitation) et d'une injection d'air (en violet) sur la catalyse de la réduction du dioxygène par <i>Pseudoalteromonas</i> sur acier inoxydable comparé à un réacteur témoin (non inoculé) sous agitation (en bleu).....	120
Figure IV-68 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,3 V/ECS, préalablement mise en contact on non (Témoin) avec une culture bactérienne de <i>Bacillus</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Roseobacter</i> ou <i>Pseudoalteromonas</i> ; en eau de mer naturelle et sous une agitation de 300 rpm. Les voltammétries cycliques ont réalisées simultanément au 6 ^{ème} jour d'expérimentation.	121
Figure IV-69 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,3 V/ECS, préalablement mise en contact on non (Témoin) avec une culture bactérienne de <i>Bacillus</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Roseobacter</i> ou <i>Pseudoalteromonas</i> ; en eau de mer naturelle et sous une agitation de 300 rpm.....	122
Figure IV-70 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,3 V/ECS, préalablement mise en contact on non (Témoin) avec une culture bactérienne de <i>Bacillus</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Roseobacter</i> ou <i>Pseudoalteromonas</i> ; en eau de mer synthétique et sous une agitation de 300 rpm.	123
Figure IV-71 : Voltammogramme (- 0,7 à + 0,3 V/ECS) d'un biofilm de <i>Bacillus</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Roseobacter</i> et <i>Pseudoalteromonas</i> sur acier inoxydable 254SMO en eau de mer synthétique à T = 0 et 14 jours.....	124
Figure IV-72 : Evolution de la densité de courant en fonction du temps sur une électrode en acier inoxydable 254SMO polarisée à - 0,3 V/ECS, préalablement mise en contact on non (Témoin) avec une culture bactérienne d' <i>Algoriphagus yeomjeoni</i> ; en eau de mer synthétique et sous une agitation de 300 rpm. Les voltammétries cycliques ont été réalisées simultanément au 5 ^{ème} jour d'expérimentation.....	126

Figure V-73 : Séparation électrophorétique des fragments d'ADN plasmidique extraits des souches 171128, 17229 et 17231. M : marqueur de taille, nd : plasmide non digéré et d : plasmide digéré.	133
Figure V-74 : Séparation électrophorétique des fragments d'ADN plasmidique des transformants $\Delta 8$, $\Delta 9$, +8 et +9.	134
Figure V-75 : Histogramme représentant la moyenne des biovolumes et d'épaisseur des biofilms lors des tests de colonisation de <i>Lactococcus lactis</i> en fonction de différents paramètres.	136
Figure V-76 : Images de microscopie confocale des biofilms de <i>Lactococcus lactis</i> en milieu M17 Glucose 0.5 % (Témoin) (A) et Glucose 1% MOPS 200 mM (B).	137
Figure V-77 : Images de microscopie confocale des biofilms de <i>Lactococcus lactis</i> en milieu M17 Glucose 0.5 % (Témoin) et NaCl 1 % (A), 2 % (B), 3 % (C) et 5 % (D).	138
Figure V-78 : Images de microscopie confocale des biofilms de <i>Lactococcus lactis</i> en milieu M17 Glucose 0.5 % (Témoin) et supplémenté avec une concentration en hémine de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A), 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B) et 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (C).	139
Figure V-79 : Images de microscopie confocale des biofilms des transformants « pil – » et « pil + » ayant incorporé un plasmide issus des souches : 17228 (A), 17229 (B) et 17231 (C) en milieu M17 Glucose 0.5 %.	140
Figure V-80 : Images de microscopie confocale des biofilms du transformant +9 en milieu M17 supplémenté en galactose 0,5 % (A) ou supplémenté en glucose 0,5 % (B).	142
Figure V-81 : Images de microscopie confocale des biofilms du transformant +31 en milieu M17 supplémenté en glucose 0,5 % et en tétracycline à 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (A) et à 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (B). .	143
Figure V-82 : Chronoampérogramme réalisé à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS en milieu « Resting cell ».	144
Figure V-83 : Chronoampérogramme à + 0,1 V/ECS et voltammogrammes réalisés entre – 0,6 et + 0,3 V/ECS en milieu M17.	145
Figure V-84 : Chronoampérogramme à + 0,1 V/ECS en milieu MCD.	146
Figure V-85 : Chronoampérogrammes réalisés à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS dans trois milieux différents : « Resting cell » (en bleu), milieu MCD (en rouge) et milieu M17 (en vert). Les interruptions dans l'enregistrement du courant sont dues à la réalisation de voltammétries cycliques.	146
Figure V-86 : Voltammogrammes réalisés entre – 0,6 et + 0,3 V/ECS en milieu MCD.	148
Figure V-87 : Voltammogrammes réalisés entre – 0,6 et + 0,3 V/ECS en milieu MCD sous barbotage de diazote (1 à 5) et d'air (6).	148
Figure V-88 : Voltammétries réalisées entre – 0,6 et + 0,3 V/ECS en milieu MCD au 4 ^{ème} jour d'expérimentation.	148
Figure V-89 : Chronoampérogrammes réalisés à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS puis – 0,3 V/ECS en milieu MCD.	149
Figure V-90 : Chronoampérogrammes réalisés à un potentiel imposé de + 0,1 V/ECS en milieu MCD avec un suivi du pH.	150

Figure V-91 : Chronoampérogrammes à + 0,1 V/ECS et voltammogrammes entre - 0,6 et + 0,3 V/ECS (1 mV/s) en milieu MCD. Les deux derniers pics apparaissent suite aux changements de milieu (indiqués par une flèche).	150
Figure V-92 : Photographies des électrodes en fin d'expérience.	151
Figure V-93 : Chronoampérogrammes à + 0,1 V/ECS et voltammogrammes réalisés entre - 0,6 et + 0,3 V/ECS et à différentes vitesses de balayage en milieu MCD à la 18 ^{ème} heure. ...	152
Figure V-94 : Tracés représentant l'intensité (courant capacitif) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage réalisés à partir des deux pics observés en Figure V-91.	153
Figure V-95 : Chronoampérogrammes à + 0,1 V/ECS et voltammogrammes réalisés entre - 0,6 et + 0,3 V/ECS et à différentes vitesses de balayage en milieu MCD lorsque plus aucun signal d'oxydation n'est visible en chronoampérométrie.	153
Figure V-96 : Voltammogrammes à impulsion différentielle effectués toute les 6 heures en milieu MCD.	154
Figure V-97 : Modèle de transfert d'électrons lors de l'oxydation du glucose par <i>Lactococcus lactis</i>	156
Figure V-98 : Modèle de transfert d'électrons lors de la réduction du dioxygène par <i>Lactococcus lactis</i>	156

Liste des tableaux

Tableau I-1 : Liste non exhaustive de PCM fonctionnant grâce à divers mécanismes de transfert d'électrons.....	18
Tableau I-2 : Types d'accepteurs d'électron et de microorganismes dans les biocathodes.(a) Densités de courant/puissances calculées sur la base du volume net de liquide cathodique. (b) vs électrode standard d'hydrogène (ESH). Valeurs vs Ag-AgCl et Hg-HgCl ₂ converties vs ESH en ajoutant respectivement 0,195 et 0,244 V. (c) Densité de courant/Puissance non fournie. (d) Potentiels de début et de fin de réduction du dioxygène (Huang et al., 2011).	24
Tableau I-3 : Tableau regroupant des biocathodes aérobies (d'après Erable et al., 2012).....	28
Tableau II-4 : Composition de l'acier inoxydable 254SMO.....	57
Tableau II-5 : Composition chimique minérale de l'eau de mer naturelle.....	61
Tableau II-6 : Composition chimique de l'eau de mer artificielle (norme ASTM D1141-90)	62
Tableau II-7 : Composition chimique de la solution de micronutriments.....	62
Tableau II-8 : Composition chimique de la solution de vitamines	63
Tableau II-9 : Composition des milieux Marine Broth et Marine Agar.....	63
Tableau II-10 : Préparation du « mix » réactionnel de la PCR.	70
Tableau II-11 : Composition du milieu « Resting Cells ».....	73
Tableau II-12 : Milieu MCD	74
Tableau II-13 : Composition empirique du milieu M17.	75
Tableau III-14 : Détails des conditions expérimentales testées pour chaque essai électrochimique mené avec la souche <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	97
Tableau IV-15 : Croissance des 4 souches isolées à partir des biofilms complexes en fonction des milieux de culture et de la nature des substrats organiques.	113
Tableau IV-16 : Bilan des densités de courant obtenues lors des différents tests électrochimiques en eau de mer naturelle et synthétique et sous une agitation de 30 rpm....	125

Références bibliographiques

- Aelterman, P., Freguia, S., Keller, J., Verstraete, W., & Rabaey, K. (2008). The anode potential regulates bacterial activity in microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(3), 409–418. doi:10.1007/s00253-007-1327-8
- Aldrovandi, A., Marsili, E., Stante, L., Paganin, P., Tabacchioni, S., & Giordano, A. (2009). Sustainable power production in a membrane-less and mediator-less synthetic wastewater microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 100(13), 3252–3260. doi:10.1016/j.biortech.2009.01.041
- Alegado, R. A., Ferriera, S., Nusbaum, C., Young, S. K., Zeng, Q., Imamovic, A., & King, N. (2011). Complete Genome Sequence of *Algoriphagus* sp PR1, Bacterial Prey of a Colony-Forming Choanoflagellate. *Journal of Bacteriology*, 193(6), 1485–1486. doi:10.1128/JB.01421-10
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., & Huse, S. M. (2009). A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *Plos One*, 4(7), e6372. doi:10.1371/journal.pone.0006372
- Bartlett, J., Gakhar, L., Penterman, J., Singh, P., Mallampalli, R. K., Porter, E., & McCray, P. B. (2011). PLUNC: a multifunctional surfactant of the airways. *Biochemical Society Transactions*, 39, 1012–1016. doi:10.1042/BST0391012
- Bast, A., Haenen, G., van den Berg, R., & van den Berg, H. (1998). Antioxidant effects of carotenoids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 68(6), 399–403.
- Benson, B. B., & Krause Jr, D. (1984). The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in freshwater and seawater in equilibrium with the atmosphere. *Limnology and Oceanography*, 29(3), 620–632.
- Bergel, A., Feron, D., & Mollica, A. (2005). Catalysis of oxygen reduction in PEM fuel cell by seawater biofilm. *Electrochemistry Communications*, 7(9), 900–904. doi:10.1016/j.elecom.2005.06.006
- Bergel, & Féron. (2002). Pile à combustible utilisant des biofilms en tant que catalyseur des réactions cathodique et/ou anodique.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316. doi:10.1074/jbc.272.33.20313
- Biers, E. J., Sun, S., & Howard, E. C. (2009). Prokaryotic Genomes and Diversity in Surface Ocean Waters: Interrogating the Global Ocean Sampling Metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 2221–2229. doi:10.1128/AEM.02118-08

- Blanchet, E., Pécastaings, S., Erable, B., Roques, C., & Bergel, A. (2014). Protons accumulation during anodic phase turned to advantage for oxygen reduction during cathodic phase in reversible bioelectrodes. *Bioresource Technology*, 173(0), 224 – 230. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.076>
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., & Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp *lactis* IL1403. *Genome Research*, 11(5), 731–753. doi:10.1101/gr.GR-1697R
- Bond, D. R., Holmes, D. E., Tender, L. M., & Lovley, D. R. (2002). Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science*, 295(5554), 483–485. doi:10.1126/science.1066771
- Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2005). Evidence for involvement of an electron shuttle in electricity generation by *Geothrix fermentans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2186–2189. doi:10.1128/AEM.71.4.2186-2189.2005
- Boulay, C., Abasova, L., Six, C., Vass, I., & Kirilovsky, D. (2008). Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1777(10), 1344–1354. doi:10.1016/j.bbabo.2008.07.002
- Bowman, J. (2006). The Marine Clade of the Family Flavobacteriaceae: The Genera *Aequorivita*, *Arenibacter*, *Cellulophaga*, *Croceibacter*, *Formosa*, *Gelidibacter*, *Gillisia*, *Maribacter*, *Mesonina*, *Muricauda*, *Polaribacter*, *Psychroflexus*, *Psychroserpens*, *Robiginitalea*, *Salegentibacter*, *Tenacibaculum*, *Ulvibacter*, *Vitellibacter* and *Zobellia*. *The Prokaryotes* (pp. 677–694). Springer New York. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30747-8_26
- Bowman, J. P., Mancuso, C., Nichols, C. M., & Gibson, J. A. E. (2003). *Algoriphagus ratkowskyi* gen. nov., sp nov., *Brumimicrobium glaciale* gen. nov., sp nov., *Cryomorpha ignava* gen. nov., sp nov and *Crocinitomix catalasitica* gen. nov., sp nov., novel flavobacteria isolated from various polar habitats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1343–1355. doi:10.1099/ij.s.0.02553-0
- Branda, S. S., Vik, A., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. doi:10.1016/j.tim.2004.11.006
- Bretschger, O., Obraztsova, A., Sturm, C. A., Chang, I. S., Gorby, Y. A., Reed, S. B., & Nealson, K. H. (2007). Current production and metal oxide reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 wild type and mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 7003–7012. doi:10.1128/AEM.01087-07
- Brinkhoff, T., Giebel, H.-A., & Simon, M. (2008). Diversity, ecology, and genomics of the *Roseobacter* clade: a short overview. *Archives of Microbiology*, 189(6), 531–539. doi:10.1007/s00203-008-0353-y
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal*, 9(15), 1551–1558.

- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 3(1), 3–8.
- Carbajosa, S., Malki, M., Caillard, R., Lopez, M. F., Palomares, F. J., Martin-Gago, J. A., & De Lacey, A. L. (2010). Electrochemical growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on a graphite electrode for obtaining a biocathode for direct electrocatalytic reduction of oxygen. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(2), 877–880. doi:10.1016/j.bios.2010.07.037
- Cercado-Quezada, B., Delia, M.-L., & Bergel, A. (2010). Treatment of dairy wastes with a microbial anode formed from garden compost. *Journal of Applied Electrochemistry*, 40(2), 225–232. doi:10.1007/s10800-009-0001-5
- Cha, J., Choi, S., Yu, H., Kim, H., & Kim, C. (2010). Directly applicable microbial fuel cells in aeration tank for wastewater treatment. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 72–79. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.07.009
- Chaudhuri, S. K., & Lovley, D. R. (2003). Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1229–1232. doi:10.1038/nbt867
- Cheng, S., Xing, D., Call, D. F., & Logan, B. E. (2009). Direct Biological Conversion of Electrical Current into Methane by Electromethanogenesis. *Environmental Science & Technology*, 43(10), 3953–3958. doi:10.1021/es803531g
- Chen, G.-W., Cha, J.-H., Choi, S.-J., Lee, T.-H., & Kim, C.-W. (2010b). Characterization of an open biocathode microbial fuel cell for electricity generation and effluent polish. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(3), 828–835. doi:10.1007/s11814-010-0142-6
- Chen, G.-W., Choi, S.-J., Cha, J.-H., Lee, T.-H., & Kim, C.-W. (2010a). Microbial community dynamics and electron transfer of a biocathode in microbial fuel. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 27(5), 1513–1520. doi:10.1007/s11814-010-0231-6
- Chen, G.-W., Choi, S.-J., Lee, T.-H., Lee, G.-Y., Cha, J.-H., & Kim, C.-W. (2008). Application of biocathode in microbial fuel cells: cell performance and microbial community. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(3), 379–388. doi:10.1007/s00253-008-1451-0
- Chen, S., Bagdasarian, M., Kaufman, M. G., & Walker, E. D. (2007). Characterization of strong promoters from an environmental *Flavobacterium hibernum* strain by using a green fluorescent protein-based reporter system. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1089–1100. doi:10.1128/AEM.01577-06
- Chen, S., He, G., Carmona-Martinez, A. A., Agarwal, S., Greiner, A., Hou, H., & Schroeder, U. (2011). Electrospun carbon fiber mat with layered architecture for anode in microbial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 13(10), 1026–1029. doi:10.1016/j.elecom.2011.06.009

- Chen, Z., Huang, Y., Liang, J., Zhao, F., & Zhu, Y. (2012). A novel sediment microbial fuel cell with a biocathode in the rice rhizosphere. *Bioresource Technology*, 108, 55–59. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.040
- Childers, S. E., Ciufo, S., & Lovley, D. R. (2002). *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature*, 416(6882), 767–769. doi:10.1038/416767a
- Clauwaert, P., Van der Ha, D., Boon, N., Verbeken, K., Verhaege, M., Rabaey, K., & Verstraete, W. (2007). Open air biocathode enables effective electricity generation with microbial fuel cells. *Environmental Science & Technology*, 41(21), 7564–7569. doi:10.1021/es0709831
- CocaignBousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P., & Lindley, N. D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70(2-4), 253–267. doi:10.1007/BF00395936
- Cohen, B. (1931). The Bacteria Culture as an Electrical Half-Cell. *Journal of Bacteriology*, 21, 18–19+.
- Compton, R. G., Perkin, S. J., Gamblin, D. P., Davis, J., Marken, F., Padden, A. N., & John, P. (2000). *Clostridium isatidis* colonised carbon electrodes: voltammetric evidence for direct solid state redox processes. *New Journal of Chemistry*, 24(3), 179–181. doi:10.1039/a909172f
- Condon, S. (1987). Responses of lactic-acid bacteria to oxygen. *Fems Microbiology Letters*, 46(3), 269–280.
- Costerton, J., Geesey, G., & Cheng, K. (1978). How Bacteria Stick. *Scientific American*,
- Costerton, J., Irvin, R., & Cheng, K. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 35, 299–324. doi:10.1146/annurev.mi.35.100181.001503
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., & Lappinscott, H. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
- Cournet, A., Berge, M., Roques, C., Bergel, A., & Delia, M.-L. (2010). Electrochemical reduction of oxygen catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa*. *Electrochimica Acta*, 55(17), 4902–4908. doi:10.1016/j.electacta.2010.03.085
- Cristiani, P., Carvalho, M. L., Guerrini, E., Daghighi, M., Santoro, C., & Li, B. (2013). Cathodic and anodic biofilms in Single Chamber Microbial Fuel Cells. *Bioelectrochemistry*, 92, 6–13. doi:10.1016/j.bioelechem.2013.01.005
- Cunat, P.-J. (2014). Aciers inoxydables Critères de choix et structure. *Techniques de L'ingénieur Aciers Inoxydables, Aciers Réfractaires et Aciers Résistant Au Fluage, base documentaire : TIB346DUO*.(ref. article : m4540).

- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–+. doi:10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
- De Beer, D., Srinivasan, R., & Stewart, P. (1994). Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4339–4344.
- DeFlaun, M. F., Oppenheimer, S. R., Streger, S., Condee, C. W., & Fletcher, M. (1999). Alterations in adhesion, transport, and membrane characteristics in an adhesion-deficient pseudomonad. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 759–765.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 76(1-4), 159–184. doi:10.1023/A:1002089722581
- Denis, M., Arnaud, S., & Malatesta, F. (1989). Hydrogen peroxyde is the end product of oxygen reduction by the terminal oxydase in the marine bacterium *Pseudomonas nautica* 617. *Febs Letters*, 247(2), 475–479. doi:10.1016/0014-5793(89)81394-8
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B. C., Hacker, J., & Steinert, M. (2001). Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infection and Immunity*, 69(4), 2116–2122. doi:10.1128/IAI.69.4.2116-2122.2001
- Dispirito, A., Silver, M., Voss, L., & Tuovinen, O. (1982). Flagella and pili of iron-oxidizing Thiobacilli isolated from a uranium-mine in Northern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(5), 1196–1200.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–+. doi:10.1128/CMR.15.2.167-193.2002
- Du, H. L., Jiao, N. Z., Hu, Y. H., & Zeng, Y. H. (2006). Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *Fems Microbiology Ecology*, 57(1), 92–105. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00090.x
- Dumas, C., Basseguy, R., & Bergel, A. (2008a). Microbial electrocatalysis with *Geobacter sulfurreducens* biofilm on stainless steel cathodes. *Electrochimica Acta*, 53(5), 2494–2500. doi:10.1016/j.electacta.2007.10.018
- Dumas, C., Mollica, A., Feron, D., Basseguy, R., Etcheverry, L., & Bergel, A. (2007). Marine microbial fuel cell: Use of stainless steel electrodes as anode and cathode materials. *Electrochimica Acta*, 53(2), 468–473. doi:10.1016/j.electacta.2007.06.069

- Dumas, C., Mollica, A., Feron, D., Basseguy, R., Etcheverry, L., & Bergel, A. (2008b). Checking graphite and stainless anodes with an experimental model of marine microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 99(18), 8887–8894. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.054
- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., & Gruss, A. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4509–4516. doi:10.1128/JB.183.15.4509-4516.2001
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16), 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Egan, S., Thomas, T., & Kjelleberg, S. (2008). Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Current Opinion in Microbiology*, 11(3), 219–225. doi:10.1016/j.mib.2008.04.001
- Erbale, B., & Bergel, A. (2009). First air-tolerant effective stainless steel microbial anode obtained from a natural marine biofilm. *Bioresource Technology*, 100(13), 3302–3307. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.025
- Erbale, B., Feron, D., & Bergel, A. (2012). Microbial Catalysis of the Oxygen Reduction Reaction for Microbial Fuel Cells: A Review. *Chemsuschem*, 5(6), 975–987. doi:10.1002/cssc.201100836
- Erbale, B., Lacroix, R., Etcheverry, L., Feron, D., Delia, M. L., & Bergel, A. (2013). Marine floating microbial fuel cell involving aerobic biofilm on stainless steel cathodes. *Bioresource Technology*, 142, 510–516. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.063
- Erbale, B., Vandecandelaere, I., Faimali, M., Delia, M.-L., Etcheverry, L., Vandamme, P., & Bergel, A. (2010). Marine aerobic biofilm as biocathode catalyst. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 51–56. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.06.006
- Even, S., Lindley, N. D., & Coccaign-Bousquet, M. (2001). Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3817–3824. doi:10.1128/JB.183.13.3817-3824.2001

- Faimali, M., Benedetti, A., Pavanello, G., Chelossi, E., Wrubl, F., & Mollica, A. (2011). Evidence of enzymatic catalysis of oxygen reduction on stainless steels under marine biofilm. *Biofouling*, 27(4), 375–384. doi:10.1080/08927014.2011.576756
- Faimali, M., Chelossi, E., Garaventa, F., Corra, C., Greco, G., & Mollica, A. (2008). Evolution of oxygen reduction current and biofilm on stainless steels cathodically polarised in natural aerated seawater. *Electrochimica Acta*, 54(1), 148–153. doi:10.1016/j.electacta.2008.02.115
- Faimali, M., Chelossi, E., Pavanello, G., Benedetti, A., Vandecandelaere, I., De Vos, P., & Mollica, A. (2010). Electrochemical activity and bacterial diversity of natural marine biofilm in laboratory closed-systems. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 30–38. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.04.012
- Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm: positioning and organisation of bacterial communities. *M S-Medecine Sciences*, 19(1), 77–83. doi:10.1051/medsci/200319177
- Fitzgerald, L. A., Petersen, E. R., Gross, B. J., Soto, C. M., Ringeisen, B. R., El-Naggar, M. Y., & Biffinger, J. C. (2012). Aggrandizing power output from *Shewanella oneidensis* MR-1 microbial fuel cells using calcium chloride. *Biosensors & Bioelectronics*, 31(1), 492–498. doi:10.1016/j.bios.2011.11.024
- Foucaud, C., Hemme, D., & Desmazeaud, M. (2001). Peptide utilization by *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Letters in Applied Microbiology*, 32(1), 20–25. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00852.x
- Franks, A. E., & Nevin, K. P. (2010). Microbial Fuel Cells, A Current Review. *Energies*, 3(5), 899–919. doi:10.3390/en3050899
- Freguia, S., Masuda, M., Tsujimura, S., & Kano, K. (2009). *Lactococcus lactis* catalyses electricity generation at microbial fuel cell anodes via excretion of a soluble quinone. *Bioelectrochemistry*, 76(1-2), 14–18. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.04.001
- Freguia, S., Tsujimura, S., & Kano, K. (2010). Electron transfer pathways in microbial oxygen biocathodes. *Electrochimica Acta*, 55(3), 813–818. doi:10.1016/j.electacta.2009.09.027
- Fuhrman, J. A., & Hagström, Å. (2008). Bacterial and Archaeal Community Structure and its Patterns. In *Microbial Ecology of the Oceans* (pp. 45–90). John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1002/9780470281840.ch3>

- Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N. D., & Cocaign-Bousquet, M. (1997). Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5282–5287.
- Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, W., Kulakauskas, S., Tremblay, J., Rezaiki, L., & Gruss, A. (2002). Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1-4), 263–269. doi:10.1023/A:1020635600343
- Gauthier, G., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes-coding for small-subunit ribosomal-RNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen-nov, and proposal of 12 new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(4), 755–761.
- Gauthier, M., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., & Bertrand, J. (1992). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen-nov, sp-nov, a new extremely halotolerant hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(4), 568–576.
- Gil, G. C., Chang, I. S., Kim, B. H., Kim, M., Jang, J. K., Park, H. S., & Kim, H. J. (2003). Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 18(4), 327–334. doi:10.1016/S0956-5663(02)00110-0
- Gonzalez, J. M., & Moran, M. A. (1997). Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4237–4242.
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., & Fredrickson, J. K. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11358–11363. doi:10.1073/pnas.0604517103
- Gregory, K. B., Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2004). Graphite electrodes as electron donors for anaerobic respiration. *Environmental Microbiology*, 6(6), 596–604. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00593.x
- Gregory, K. B., & Lovley, D. R. (2005). Remediation and recovery of uranium from contaminated subsurface environments with electrodes. *Environmental Science & Technology*, 39(22), 8943–8947. doi:10.1021/es050457e

- Habermann, W., & Pommer, E. (1991). Biological fuel cells with sulfide storage capacity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(1), 128–133.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. doi:10.1038/nrmicro821
- Hamidi, M., Hejazi, M., Nazemyieh, H., Maleki, B., Hejazi, M., Naziri, D., & Hassanzadeh, S. (2012). Study of carotenoid production by *Marinobacter* sp. TBZ112 isolated from Urmia lake in north-western of Iran. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(5), S492.
- Hasvold, O., Henriksen, H., Melvaer, E., Citi, G., Johansen, B. O., Kjonigsen, T., & Galetti, R. (1997). Sea-water battery for subsea control systems. *Journal of Power Sources*, 65(1-2), 253–261. doi:10.1016/S0378-7753(97)02477-4
- Heip, C. H. R., Goosen, N. K., Herman, P. M. J., Kromkamp, J., Middelburg, J. J., & Soetaert, K. (1995). Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries. In A. D. Ansell, R. N. Gibson, & M. Barnes (Eds.), *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review, Vol 33* (Vol. 33, pp. 1–149). London: U C L Press Ltd.
- He, Z., & Angenent, L. T. (2006). Application of bacterial biocathodes in microbial fuel cells. *Electroanalysis*, 18(19-20), 2009–2015. doi:10.1002/elan.200603628
- Holmes, D. E., Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2004a). Electron transfer by *Desulfobulbus propionicus* to Fe(III) and graphite electrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1234–1237. doi:10.1128/AEM.70.2.1234-1237.2004
- Holmes, D. E., Bond, D. R., O'Neill, R. A., Reimers, C. E., Tender, L. R., & Lovley, D. R. (2004b). Microbial communities associated with electrodes harvesting electricity from a variety of aquatic sediments. *Microbial Ecology*, 48(2), 178–190. doi:10.1007/s00248-003-0004-4
- Holmes, D. E., Chaudhuri, S. K., Nevin, K. P., Mehta, T., Methe, B. A., Liu, A., & Lovley, D. R. (2006). Microarray and genetic analysis of electron transfer to electrodes in *Geobacter sulfurreducens*. *Environmental Microbiology*, 8(10), 1805–1815. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01065.x
- Holmes, D. E., Nicoll, J. S., Bond, D. R., & Lovley, D. R. (2004c). Potential role of a novel psychrotolerant member of the family Geobacteraceae, *Geopsychrobacter electrodiphilus* gen. nov., sp nov., in electricity production by a marine sediment fuel cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6023–6030. doi:10.1128/AEM.70.10.6023-6030.2004
- Ho, P. I., Kumar, G. G., Kim, A. R., Kim, P., & Nahm, K. S. (2011). Microbial electricity generation of diversified carbonaceous electrodes under variable mediators. *Bioelectrochemistry*, 80(2), 99–104. doi:10.1016/j.bioelechem.2010.06.007

- Huang, L., Chen, J., Quan, X., & Yang, F. (2010). Enhancement of hexavalent chromium reduction and electricity production from a biocathode microbial fuel cell. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(8), 937–945. doi:10.1007/s00449-010-0417-7
- Huang, L., Regan, J. M., & Quan, X. (2011). Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(1), 316–323. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.096
- Huse, S. M., Huber, J. A., Morrison, H. G., Sogin, M. L., & Mark Welch, D. (2007). Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology*, 8(7), R143. doi:10.1186/gb-2007-8-7-r143
- Ieropoulos, I., Greenman, J., & Melhuish, C. (2012). Urine utilisation by microbial fuel cells; energy fuel for the future. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(1), 94–98. doi:10.1039/c1cp23213d
- Iken, H., Etcheverry, L., Bergel, A., & Basseguy, R. (2008). Local analysis of oxygen reduction catalysis by scanning vibrating electrode technique: A new approach to the study of biocorrosion. *Electrochimica Acta*, 54(1), 60–65. doi:10.1016/j.electacta.2008.02.120
- Ivanova, E. P., Vysotskii, M. V., Svetashev, V. I., Nedashkovskaya, O. I., Gorshkova, N. M., Mikhailov, V. V., & Yoshikawa, S. (1999). Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2(4), 267–71.
- Jensen, N. B. S., Melchiorson, C. R., Jokumsen, K. V., & Villadsen, J. (2001). Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6), 2677–2682. doi:10.1128/AEM.67.6.2677-2682.2001
- Jiang, Y., Su, M., & Li, D. (2014). Removal of Sulfide and Production of Methane from Carbon Dioxide in Microbial Fuel Cells-Microbial Electrolysis Cell (MFCs-MEC) Coupled System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2720–2731. doi:10.1007/s12010-013-0718-9
- Johnson, L. R. (2008). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 251(1), 24–34. doi:10.1016/j.jtbi.2007.10.039

- Kaneko, T., et al., M., & H. (1990). Acetoin fermentation by citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 3022 grown aerobically in the presence of hemin or Cu²⁺. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2644–2649.
- Karube, I., Matsunaga, T., Tsuru, S., & Suzuki, S. (1977). Biochemical fuel cell utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 19(11), 1727–1733. doi:10.1002/bit.260191112
- Katebian, L., & Jiang, S. C. (2013). Marine bacterial biofilm formation and its responses to periodic hyperosmotic stress on a flat sheet membrane for seawater desalination pretreatment. *Journal of Membrane Science*, 425, 182–189. doi:10.1016/j.memsci.2012.08.027
- Kim, H. J., Park, H. S., Hyun, M. S., Chang, I. S., Kim, M., & Kim, B. H. (2002). A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(2), 145–152. doi:10.1016/S0141-0229(01)00478-1
- Kim In.S., Chae K-J., Choi M-J., & Verstraete W. (2008). Microbial Fuel Cells: Recent Advances, Bacterial Communities and Application Beyond Electricity Generation. *Environ Eng Res*, 13(2), 51–65. doi:10.4491/eer.2008.13.2.51
- Kim, J. R., Min, B., & Logan, B. E. (2005). Evaluation of procedures to acclimate a microbial fuel cell for electricity production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 23–30. doi:10.1007/s00253-004-1845-6
- Kim, N., Choi, Y., Jung, S., & Kim, S. (2000). Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 70(1), 109–114. doi:10.1002/1097-0290(20001005)70:1
- Kirov, S. M. (2003). Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *Fems Microbiology Letters*, 224(2), 151–159. doi:10.1016/S0378-1097(03)00445-2
- Klausen, M., Gjermansen, M., Kreft, J. U., & Tolker-Nielsen, T. (2006). Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *Fems Microbiology Letters*, 261(1), 1–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00280.x
- Knowles, R. (1982). Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46(1), 43–70.
- Kolter, R., & Greenberg, E. P. (2006). Microbial sciences - The superficial life of microbes. *Nature*, 441(7091), 300–302. doi:10.1038/441300a
- Kriwy, P., & Uthicke, S. (2011). Microbial diversity in marine biofilms along a water quality gradient on the Great Barrier Reef. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 116–126. doi:10.1016/j.syapm.2011.01.003

- Lan, C. Q., Oddone, G., Mills, D. A., & Block, D. E. (2006). Kinetics of *Lactococcus lactis* growth and metabolite formation under aerobic and anaerobic conditions in the presence or absence of hemin. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6), 1070–1080. doi:10.1002/bit.21070
- Langumier, M., Lanneluc, I., Sabot, R., Jeannin, M., Refait, P., & Sablé, S. (2011). Quelles sont les bactéries présentes dans les biofilms formés sur acier en milieu marin? *Matériaux & Techniques*, 99(5), 591–603. doi:10.1051/mattech/2011114
- Lapinsonniere, L., Picot, M., Poriél, C., & Barriere, F. (2013). Phenylboronic Acid Modified Anodes Promote Faster Biofilm Adhesion and Increase Microbial Fuel Cell Performances. *Electroanalysis*, 25(3), 601–605. doi:10.1002/elan.201200351
- Leang, C., Coppi, M. V., & Lovley, D. R. (2003). OmcB, a c-type polyheme cytochrome, involved in Fe(III) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of Bacteriology*, 185(7), 2096–2103. doi:10.1128/JB.185.7.2096-2103.2003
- Lee, S., & Elimelech, M. (2007). Salt cleaning of organic-fouled reverse osmosis membranes. *Water Research*, 41(5), 1134–1142. doi:10.1016/j.watres.2006.11.043
- Lefebvre, O., Tan, Z., Kharkwal, S., & Ng, H. Y. (2012). Effect of increasing anodic NaCl concentration on microbial fuel cell performance. *Bioresource Technology*, 112, 336–340. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.048
- Leriche, V., Chassaing, D., & Carpentier, B. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 51(2-3), 169–182. doi:10.1016/S0168-1605(99)00128-2
- Liang, P., Fan, M., Cao, X., & Huang, X. (2009). Evaluation of applied cathode potential to enhance biocathode in microbial fuel cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(5), 794–799. doi:10.1002/jctb.2114
- Lin, S. S., & Gurol, M. D. (1998). Catalytic decomposition of hydrogen peroxide on iron oxide: Kinetics, mechanism, and implications. *Environmental Science & Technology*, 32(10), 1417–1423. doi:10.1021/es970648k
- Little, B., & Jacobus, J. (1985). A comparison of two techniques for the isolation of adsorbed dissolved organic material from seawater. *Organic Geochemistry*, 8(1), 27 – 33. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0146-6380(85)90047-6
- Liu, H., Newton, G. J., Nakamura, R., Hashimoto, K., & Nakanishi, S. (2010). Electrochemical Characterization of a Single Electricity-Producing Bacterial Cell of *Shewanella* by Using Optical Tweezers. *Angewandte Chemie-International Edition*, 49(37), 6596–6599. doi:10.1002/anie.201000315
- Liu, M., Yuan, Y., Zhang, L., Zhuang, L., Zhou, S., & Ni, J. (2010). Bioelectricity generation by a Gram-positive *Corynebacterium* sp. strain {MFC03} under alkaline condition in microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 101(6), 1807 – 1811. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.003

- Liu, X., Ramsey, M. M., Chen, X., Koley, D., Whiteley, M., & Bard, A. J. (2011). Real-time mapping of a hydrogen peroxide concentration profile across a polymicrobial bacterial biofilm using scanning electrochemical microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 2668–2673. doi:10.1073/pnas.1018391108
- Liu, Y., Climent, V., Berna, A., & Miguel Feliu, J. (2011). Effect of Temperature on the Catalytic Ability of Electrochemically Active Biofilm as Anode Catalyst in Microbial Fuel Cells. *Electroanalysis*, 23(2), 387–394. doi:10.1002/elan.201000499
- Liu, Y., Harnisch, F., Fricke, K., Sietmann, R., & Schroeder, U. (2008). Improvement of the anodic bioelectrocatalytic activity of mixed culture biofilms by a simple consecutive electrochemical selection procedure. *Biosensors & Bioelectronics*, 24(4), 1006–1011. doi:10.1016/j.bios.2008.08.001
- Liu, Z. D., Du, Z. W., Lian, J., Zhu, X. Y., Li, S. H., & Li, H. R. (2007). Improving energy accumulation of microbial fuel cells by metabolism regulation using *Rhodospirillum rubrum* as biocatalyst. *Letters in Applied Microbiology*, 44(4), 393–398. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02088.x
- Li, Y., Hugenholtz, J., Abee, T., & Molenaar, D. (2003). Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5739–5745. doi:10.1128/AEM.69.10.5739-5745.2003
- Logan, B. E. (2009). Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cells. *Nature Reviews Microbiology*, 7(5), 375–381. doi:10.1038/nrmicro2113
- Lovley, D. (1991). Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews*, 55(2), 259–287.
- Lovley, D. R. (2006). Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 497–508. doi:10.1038/nrmicro1442
- Lovley, D. R. (2008). The microbe electric: conversion of organic matter to electricity. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(6), 564–571. doi:10.1016/j.copbio.2008.10.005
- Lovley, D. R., & Nevin, K. P. (2011). A shift in the current: New applications and concepts for microbe-electrode electron exchange. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 441–448. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.009
- Lu, M., & Li, S. F. Y. (2012). Cathode Reactions and Applications in Microbial Fuel Cells: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(23), 2504–2525. doi:10.1080/10643389.2011.592744
- Luo, H. L., Wan, K., & Wang, H. H. (2005). High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAM beta 1 transmission by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2970–2978. doi:10.1128/AEM.71.6.2970-2978.2005

- Malki, M., De lacey Antonio L., Rodrfiguez, N., Amils, R., & Fernandez, V. M. (2008). Preferential use of an anode as an electron acceptor by an acidophilic bacterium in the presence of oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14), 4472–4476. doi:10.1128/AEM.00209-08
- Malvankar, N. S., Vargas, M., Nevin, K. P., Franks, A. E., Leang, C., Kim, B.-C., & Lovley, D. R. (2011). Tunable metallic-like conductivity in microbial nanowire networks. *Nat Nano*, 6(9), 573–579. doi:10.1038/nnano.2011.119
- Marshall, C. W., & May, H. D. (2009). Electrochemical evidence of direct electrode reduction by a thermophilic Gram-positive bacterium, *Thermincola ferriacetica*. *Energy & Environmental Science*, 2(6), 699–705. doi:10.1039/b823237g
- Marshall, C. W., Ross, D. E., Fichot, E. B., Norman, R. S., & May, H. D. (2012). Electrosynthesis of Commodity Chemicals by an Autotrophic Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8412–8420. doi:10.1128/AEM.02401-12
- Marsili, E., Baron, D. B., Shikhare, I. D., Coursolle, D., Gralnick, J. A., & Bond, D. R. (2008). *Shewanella* Secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3968–3973. doi:10.1073/pnas.0710525105
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39–50. doi:10.1038/nrmicro2695
- Melchiorson, C. R., Jokumsen, K. V., Villadsen, J., Johnsen, M. G., Israelsen, H., & Arnau, J. (2000). Synthesis and posttranslational regulation of pyruvate formate-lyase in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4783–4788. doi:10.1128/JB.182.17.4783-4788.2000
- Mercier, C., Durrieu, C., Briandet, R., Domakova, E., Tremblay, J., Buist, G., & Kulakauskas, S. (2002). Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 46(1), 235–243. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03160.x
- Milliken, C. E., & May, H. D. (2007). Sustained generation of electricity by the spore-forming, Gram-positive, *Desulfitobacterium hafniense* strain DCB2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5), 1180–1189. doi:10.1007/s00253-006-0564-6
- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J.-J., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P., & Azevedo, V. (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 2(4), 348–59.
- Mollica, & Travis. (1976). *Corrélation entre la formation de la pellicule primaire et la modification de la réaction cathodique sur des aciers inoxydables expérimentés en eau de mer aux vitesses de 0,3 à 5,2 mV/s*. Presented at the Proceedings of Fourth International Congress on Marine Corrosion and Fouling, Juan-les-Pins, Antibes, France.

- Nealson, K., & Saffarini, D. (1994). Iron and manganese in anaerobic respiration - Environmental significance, physiology, and regulation. *Annual Review of Microbiology*, 48, 311–343. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.001523
- Nedashkovskaya, O. I., Vancanneyt, M., Van Trappen, S., Vandemeulebroecke, K., Lysenko, A. M., Rohde, M., & Swings, J. (2004). Description of *Algoriphagus aquimarinus* sp nov., *Algoriphagus chordae* sp nov and *Algoriphagus winogradskyi* sp nov., from sea water and algae, transfer of *Hongiella halophila* Yi and Chun 2004 to the genus *Algoriphagus* as *Algoriphagus halophilus* comb. nov and emended descriptions of the genera *Algoriphagus* Bowman et al. 2003 and *Hongiella* Yi and Chun 2004. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 1757–1764. doi:10.1099/ijs.0.02915-0
- Neves, A. R., Pool, W. A., Kok, J., Kuipers, O. P., & Santos, H. (2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - The input from in vivo NMR. *Fems Microbiology Reviews*, 29(3), 531–554. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.005
- Neves, A. R., Pool, W. A., Solopova, A., Kok, J., Santos, H., & Kuipers, O. P. (2010). Towards Enhanced Galactose Utilization by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7048–7060. doi:10.1128/AEM.01195-10
- Nevin, K. P., Woodard, T. L., Franks, A. E., Summers, Z. M., & Lovley, D. R. (2010). Microbial Electrosynthesis: Feeding Microbes Electricity To Convert Carbon Dioxide and Water to Multicarbon Extracellular Organic Compounds. *Mbio*, 1(2), e00103–10. doi:10.1128/mBio.00103-10
- Nguyen, T. A., LU, Y., Yang, X., & Shi, X. (2007). Carbon and steel surfaces modified by *Leptothrix discophora* SP-6: Characterization and implications. *Environmental Science & Technology*, 41(23), 7987–7996. doi:10.1021/es071178p
- Niessen, J., Harnisch, F., Rosenbaum, M., Schroder, U., & Scholz, F. (2006). Heat treated soil as convenient and versatile source of bacterial communities for microbial electricity generation. *Electrochemistry Communications*, 8(5), 869–873. doi:10.1016/j.elecom.2006.03.025
- Niessen, J., Schroder, U., Rosenbaum, M., & Scholz, F. (2004a). Fluorinated polyanilines as superior materials for electrocatalytic anodes in bacterial fuel cells. *Electrochemistry Communications*, 6(6), 571–575. doi:10.1016/j.elecom.2004.04.006
- Niessen, J., Schroder, U., & Scholz, F. (2004b). Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation - a bacterial fuel cell operating on starch. *Electrochemistry Communications*, 6(9), 955–958. doi:10.1016/j.elecom.2004.07.010
- Nimje, V. R., Chen, C.-Y., Chen, C.-C., Jean, J.-S., Reddy, A. S., Fan, C.-W., & Chen, J.-L. (2009). Stable and high energy generation by a strain of *Bacillus subtilis* in a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources*, 190(2), 258–263. doi:10.1016/j.jpowsour.2009.01.019

- Orla-Jensen. (1919). *The lactic acid bacteria*. Copenhagen, Holst.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295–304. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x
- Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Dieye, Y., Herry, J.-M., Pechoux, C., Meylheuc, T., & Piard, J.-C. (2012). Pilus Biogenesis in *Lactococcus lactis*: Molecular Characterization and Role in Aggregation and Biofilm Formation. *Plos One*, 7(12), e50989. doi:10.1371/journal.pone.0050989
- Pane, L., Radin, L., Franconi, G., & Carli, A. (1996). The carotenoid pigments of a marine *Bacillus firmus* strain. *Bollettino Della Societa Italiana Di Biologia Sperimentale*, 72(11-12), 303–8.
- Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., & Vanbroekhoven, K. (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresource Technology*, 101(6), 1533–1543. doi:10.1016/j.biortech.2009.10.017
- Papagianni, M., Avramidis, N., & Filiouis, G. (2007). Glycolysis and the regulation of glucose transport in *Lactococcus lactis* spp. *lactis* in batch and fed-batch culture. *Microbial Cell Factories*, 6, 16. doi:10.1186/1475-2859-6-16
- Park, D. H., Kim, B. H., Moore, B., Hill, H. A. O., Song, M. K., & Rhee, H. W. (1997). Electrode reaction of *Desulfovibrio desulfuricans* modified with organic conductive compounds. *Biotechnology Techniques*, 11(3), 145–148. doi:10.1023/A:1018441127733
- Park, D. H., Kim, S. K., Shin, I. H., & Jeong, Y. J. (2000). Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode with Neutral Red. *Biotechnology Letters*, 22(16), 1301–1304. doi:10.1023/A:1005674107841
- Park, D. H., & Zeikus, J. G. (2000). Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1292–1297. doi:10.1128/AEM.66.4.1292-1297.2000
- Park, H. I., Kim, D. K., Choi, Y. J., & Pak, D. (2005). Nitrate reduction using an electrode as direct electron donor in a biofilm-electrode reactor. *Process Biochemistry*, 40(10), 3383–3388. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.017
- Park, H. S., Kim, B. H., Kim, H. S., Kim, H. J., Kim, G. T., Kim, M., & Chang, H. I. (2001). A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe*, 7(6), 297–306. doi:10.1006/anae.2001.0399
- Parsek, M. R., & Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 27–33. doi:10.1016/j.tim.2004.11.007

- Pasmore, M., & Costerton, J. W. (2003). Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(7), 407–413. doi:10.1007/s10295-003-0069-6
- Patil, S. A., Harnisch, F., Kapadnis, B., & Schroeder, U. (2010). Electroactive mixed culture biofilms in microbial bioelectrochemical systems: The role of temperature for biofilm formation and performance. *Biosensors & Bioelectronics*, 26(2), 803–808. doi:10.1016/j.bios.2010.06.019
- Perera-Costa, D., Morales Bruque, J., Luisa Gonzalez-Martin, M., Candido Gomez-Garcia, A., & Vadillo-Rodriguez, V. (2014). Studying the Influence of Surface Topography on Bacterial Adhesion using Spatially Organized Microtopographic Surface Patterns. *Langmuir*, 30(16), 4633–4641. doi:10.1021/la5001057
- Pernthaler, J., & Amann, R. (2005). Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: Focus on populations. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(3), 440–+. doi:10.1128/MMBR.69.3.440-461.2005
- Pham, T. H., Boon, N., Aelterman, P., Clauwaert, P., De Schamphelaire, L., Vanhaecke, L., & Rabaey, K. (2008). Metabolites produced by *Pseudomonas* sp enable a Gram-positive bacterium to achieve extracellular electron transfer. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5), 1119–1129. doi:10.1007/s00253-007-1248-6
- Pirbadian, S., Barchinger, S. E., Leung, K. M., Byun, H. S., Jangir, Y., Bouhenni, R. A., & El-Naggar, M. Y. (2014). *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires are outer membrane and periplasmic extensions of the extracellular electron transport components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35), 12883–12888. doi:10.1073/pnas.1410551111
- Pommier, T., Canback, B., Riemann, L., Bostrom, K. H., Simu, K., Lundberg, P., & Hagstrom, A. (2007). Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology*, 16(4), 867–880. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03189.x
- Pons, L., Delia, M.-L., & Bergel, A. (2011). Effect of surface roughness, biofilm coverage and biofilm structure on the electrochemical efficiency of microbial cathodes. *Bioresource Technology*, 102(3), 2678–2683. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.138
- Potter, M. C. (1911). Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 84(571), 260–276. doi:10.2307/80609
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285–293. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x

- Qian, P.-Y., Lau, S. C. K., Dahms, H.-U., Dobretsov, S., & Harder, T. (2007). Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology*, 9(4), 399–410. doi:10.1007/s10126-007-9001-9
- Qiao, Y., Li, C. M., Bao, S.-J., Lu, Z., & Hong, Y. (2008). Direct electrochemistry and electrocatalytic mechanism of evolved *Escherichia coli* cells in microbial fuel cells. *Chemical Communications*, (11), 1290–1292. doi:10.1039/b719955d
- Quince, C., Lanzen, A., Davenport, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2011). Removing Noise From Pyrosequenced Amplicons. *Bmc Bioinformatics*, 12, 38. doi:10.1186/1471-2105-12-38
- Rabaey, K., Boon, N., Hofte, M., & Verstraete, W. (2005). Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environmental Science & Technology*, 39(9), 3401–3408. doi:10.1021/es048563o
- Rabaey, K., Boon, N., Siciliano, S. D., Verhaege, M., & Verstraete, W. (2004). Biofuel cells select for microbial consortia that self-mediate electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5373–5382. doi:10.1128/AEM.70.9.5373-5382.2004
- Rabaey, K., Read, S. T., Clauwaert, P., Freguia, S., Bond, P. L., Blackall, L. L., & Keller, J. (2008). Cathodic oxygen reduction catalyzed by bacteria in microbial fuel cells. *Isme Journal*, 2(5), 519–527. doi:10.1038/ismej.2008.1
- Rabaey, K., Rodriguez, J., Blackall, L. L., Keller, J., Gross, P., Batstone, D., & Neelson, K. H. (2007). Microbial ecology meets electrochemistry: electricity-driven and driving communities. *Isme Journal*, 1(1), 9–18. doi:10.1038/ismej.2007.4
- Rappe, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57, 369–394. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090759
- Ravenschlag, K., Sahm, K., & Amann, R. (2001). Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine Arctic sediments (Svalbard). *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 387–395. doi:10.1128/AEM.67.1.387-395.2001
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., & Lovley, D. R. (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature*, 435(7045), 1098–1101. doi:10.1038/nature03661
- Reguera, G., Nevin, K. P., Nicoll, J. S., Covalla, S. F., Woodard, T. L., & Lovley, D. R. (2006). Biofilm and nanowire production leads to increased current in *Geobacter sulfurreducens* fuel cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7345–7348. doi:10.1128/AEM.01444-06
- Reimers, C. E., Girguis, P., Stecher, H. A., Tender, L. M., Ryckelynck, N., & Whaling, P. (2006). Microbial fuel cell energy from an ocean cold seep. *Geobiology*, 4(2), 123–136. doi:10.1111/j.1472-4669.2006.00071.x

- Reimers, C. E., Tender, L. M., Fertig, S., & Wang, W. (2001). Harvesting energy from the marine sediment-water interface. *Environmental Science & Technology*, 35(1), 192–195. doi:10.1021/es001223s
- Renslow, R., Donovan, C., Shim, M., Babauta, J., Nannapaneni, S., Schenk, J., & Beyenal, H. (2011). Oxygen reduction kinetics on graphite cathodes in sediment microbial fuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(48), 21573–21584. doi:10.1039/c1cp23200b
- Rezaei, F., Richard, T. L., & Logan, B. E. (2009). Analysis of chitin particle size on maximum power generation, power longevity, and Coulombic efficiency in solid-substrate microbial fuel cells. *Journal of Power Sources*, 192(2), 304–309. doi:10.1016/j.jpowsour.2009.03.023
- Rezaiki, L., Cesselin, B., Yamamoto, Y., Vido, K., van West, E., Gaudu, P., & Gruss, A. (2004). Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 53(5), 1331–1342. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04217.x
- Rezaiki, L., Lamberet, G., Derre, A., Gruss, A., & Gaudu, P. (2008). *Lactococcus lactis* produces short-chain quinones that cross-feed Group B *Streptococcus* to activate respiration growth. *Molecular Microbiology*, 67(5), 947–957. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06083.x
- Rhoads, A., Beyenal, H., & Lewandowski, Z. (2005). Microbial fuel cell using anaerobic respiration as an anodic reaction and biomineralized manganese as a cathodic reactant. *Environmental Science & Technology*, 39(12), 4666–4671. doi:10.1021/es048386r
- Riccioni, G., D’Orazio, N., Franceschelli, S., & Speranza, L. (2011). Marine Carotenoids and Cardiovascular Risk Markers. *Marine Drugs*, 9(7), 1166–1175. doi:10.3390/md9071166
- Roberts, R. J., & Macelis, D. (1997). REBASE restriction enzymes and methylases. *Nucleic Acids Research*, 25(1), 248–262. doi:10.1093/nar/25.1.248
- Rosenbaum, M., Aulenta, F., Villano, M., & Angenent, L. T. (2011). Cathodes as electron donors for microbial metabolism: Which extracellular electron transfer mechanisms are involved? *Bioresource Technology*, 102(1), 324–333. doi:10.1016/j.biortech.2010.07.008
- Rousseau, R., Santaella, C., Achouak, W., Godon, J.-J., Bonnafous, A., Bergel, A., & Délia, M.-L. (2014). Correlation of the Electrochemical Kinetics of High-Salinity-Tolerant Bioanodes with the Structure and Microbial Composition of the Biofilm. *ChemElectroChem*, n/a–n/a. doi:10.1002/celc.201402153
- Rusch, D. B., Halpern, A. L., Sutton, G., Heidelberg, K. B., Williamson, S., Yooseph, S., & Venter, J. C. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *Plos Biology*, 5(3), 398–431. doi:10.1371/journal.pbio.0050077

- Sachindra, N. M., Sato, E., Maeda, H., Hosokawa, M., Niwano, Y., Kohno, M., & Miyashita, K. (2007). Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8516–8522. doi:10.1021/jf071848a
- Salako, N., & Kleinberg, I. (1992). Comparison of the effects of galactose and glucose on the pH responses. *Archives of Oral Biology*, 37(10), 821–829. doi:10.1016/0003-9969(92)90116-P
- Salauen, S., La Barre, S., Dos Santos-Goncalvez, M., Potin, P., Haras, D., & Bazire, A. (2012). Influence of Exudates of the Kelp *Laminaria Digitata* on Biofilm Formation of Associated and Exogenous Bacterial Epiphytes. *Microbial Ecology*, 64(2), 359–369. doi:10.1007/s00248-012-0048-4
- Sanders, J., Leenhouts, K., Haandrikman, A., Venema, G., & Kok, J. (1995). Stress-response in *Lactococcus lactis* - Cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology*, 177(18), 5254–5260.
- Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., & Gilbert, P. (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7312–7326. doi:10.1128/JB.186.21.7312-7326.2004
- Schneider, R., Chadwick, B. R., Pembrey, R., Jankowski, J., & Acworth, I. (1994). Retention of the Gram-negative bacterium {SW8} on surfaces under conditions relevant to the subsurface environment: Effects of conditioning films and substratum nature. *{FEMS} Microbiology Ecology*, 14(3), 243 – 254. doi:http://dx.doi.org/
- Schroder, U., Niessen, J., & Scholz, F. (2003). A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude. *Angewandte Chemie-International Edition*, 42(25), 2880–2883. doi:10.1002/anie.200350918
- Schwieger, C., & Blume, A. (2007). Interaction of poly(L-lysines) with negatively charged membranes: an FT-IR and DSC study. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 36(4-5), 437–450. doi:10.1007/s00249-006-0080-8
- Scotto, V., Dicintio, R., & Marcenaro, G. (1985). The influence of marine aerobic microbial film on stainless steel corrosion behavior. *Corrosion Science*, 25(3), 185–194. doi:10.1016/0010-938X(85)90094-0
- Scotto, V., & Lai, M. E. (1998). The ennoblement of stainless steels in seawater: A likely explanation coming from the field. *Corrosion Science*, 40(6), 1007–1018. doi:10.1016/S0010-938X(98)00038-9
- Sevda, S., & Sreekrishnan, T. R. (2014). Removal of organic matters and nitrogenous pollutants simultaneously from two different wastewaters using biocathode microbial fuel cell. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 49(11), 1265–1275. doi:10.1080/10934529.2014.910064

- Shiba, T. (1991). *Roseobacter litoralis* gen. nov., sp. nov., and *Roseobacter denitrificans* sp. nov., Aerobic Pink-Pigmented Bacteria which Contain Bacteriochlorophyll a. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(2), 140–145. doi:10.1016/S0723-2020(11)80292-4
- Shindo, K., & Misawa, N. (2014). New and Rare Carotenoids Isolated from Marine Bacteria and Their Antioxidant Activities. *Marine Drugs*, 12(3), 1690–1698. doi:10.3390/md12031690
- Shukla, A. K., Suresh, P., Berchmans, S., & Rajendran, A. (2004). Biological fuel cells and their applications. *Current Science*, 87(4), 455–468.
- Song, T.-S., & Jiang, H.-L. (2011). Effects of sediment pretreatment on the performance of sediment microbial fuel cells. *Bioresource Technology*, 102(22), 10465–10470. doi:10.1016/j.biortech.2011.08.129
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345–51. doi:10.1016/S0098-2997(03)00030-X
- Stanley, N. R., Britton, R. A., Grossman, A. D., & Lazazzera, B. A. (2003). Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1951–1957.
- Staroscik, A. M., Hunnicutt, D. W., Archibald, K. E., & Nelson, D. R. (2008). Development of methods for the genetic manipulation of *Flavobacterium columnare*. *Bmc Microbiology*, 8, 115. doi:10.1186/1471-2180-8-115
- Stone, B. J., & Abu Kwaik, Y. (1998). Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: Identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity*, 66(4), 1768–1775.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
- Strycharz-Glaven, S. M., Glaven, R. H., Wang, Z., Zhou, J., Vora, G. J., & Tender, L. M. (2013). Electrochemical Investigation of a Microbial Solar Cell Reveals a Nonphotosynthetic Biocathode Catalyst. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 3933–3942. doi:10.1128/AEM.00431-13
- Strycharz-Glaven, S. M., Snider, R. M., Guiseppi-Elie, A., & Tender, L. M. (2011). On the electrical conductivity of microbial nanowires and biofilms. *Energy & Environmental Science*, 4(11), 4366–4379. doi:10.1039/C1EE01753E
- Strycharz, S. M., Malanoski, A. P., Snider, R. M., Yi, H., Lovley, D. R., & Tender, L. M. (2011). Application of cyclic voltammetry to investigate enhanced catalytic current generation by biofilm-modified anodes of *Geobacter sulfurreducens* strain DL1 vs. variant strain KN400. *Energy & Environmental Science*, 4(3), 896–913. doi:10.1039/c0ee00260g

- Strycharz, S. M., Woodard, T. L., Johnson, J. P., Nevin, K. P., Sanford, R. A., Loeffler, F. E., & Lovley, D. R. (2008). Graphite electrode as a sole electron donor for reductive dechlorination of tetrachlorethene by *Geobacter lovleyi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5943–5947. doi:10.1128/AEM.00961-08
- Sun, F., Wang, B., Li, G., Liu, X., Du, Y., Lai, Q., & Shao, Z. (2008). Diversity of bacteria isolated from the South China Sea sediments. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, 48(12), 1578–87.
- Suzuki, M. T., & Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 625–630.
- Suzuki, M. T., Preston, C. M., Chavez, F. P., & DeLong, E. F. (2001). Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: field tests across an upwelling plume in Monterey Bay. *Aquatic Microbial Ecology*, 24(2), 117–127. doi:10.3354/ame024117
- Tanisho, S., Kamiya, N., & Wakao, N. (1989). Microbial fuel cell using *Enterobacter aerogenes*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 21(1), 25–32. doi:10.1016/0302-4598(89)87003-5
- Tao, L., Yao, H., Kasai, H., Misawa, N., & Cheng, Q. (2006). A carotenoid synthesis gene cluster from *Algoriphagus* sp KK10202C with a novel fusion-type lycopene beta-cyclase gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(1), 79–86. doi:10.1007/s00438-006-0121-0
- Tender, L. M., Reimers, C. E., Stecher, H. A., Holmes, D. E., Bond, D. R., Lowy, D. A., & Lovley, D. R. (2002). Harnessing microbially generated power on the seafloor. *Nature Biotechnology*, 20(8), 821–825. doi:10.1038/nbt716
- Ter Heijne, A., Schaetzle, O., Gimenez, S., Fabregat-Santiago, F., Bisquert, J., Strik, D. P. B. T. B., & Hamelers, H. V. M. (2011). Identifying charge and mass transfer resistances of an oxygen reducing biocathode. *Energy & Environmental Science*, 4(12), 5035–5043. doi:10.1039/c1ee02131a
- Thomas, W. E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V., & Sokurenko, E. V. (2002). Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell*, 109(7), 913–923. doi:10.1016/S0092-8674(02)00796-1
- Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S., Pelletier, D. A., & Spormann, A. M. (2004). Initial phases of biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology*, 186(23), 8096–8104. doi:10.1128/JB.186.23.8096-8104.2004
- Thurston, C., Benneto, H., Delaney, G., Mason, J., Roller, S., & Stirling, J. (1985). Glucose metabolism in a microbial fuel cell stoichiometry of product formation in a thionine-mediated *Proteus vulgaris* fuel cell and its relation to coulombic yields. *Journal of General Microbiology*, 131(JUN), 1393–1401.

- Top, E., Mergeay, M., Springael, D., & Verstraete, W. (1990). Gene escape model - Transfer of heavy-metal resistance genes from *Escherichia coli* to *Alcaligenes eutrophus* on agar plates and in soil samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2471–2479.
- Underwood, G. J. C., & Paterson, D. M. (2003). The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Advances in Botanical Research, Vol 40*, 40, 183–240. doi:10.1016/S0065-2296(05)40005-1
- Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6911–6916. doi:10.1073/pnas.111551898
- Vandecandelaere, I., Nercessian, O., Faimali, M., Segaert, E., Mollica, A., Achouak, W., & Vandamme, P. (2010). Bacterial diversity of the cultivable fraction of a marine electroactive biofilm. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 62–66. doi:10.1016/j.bioelechem.2009.07.004
- Van Loosdrecht, M. C., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1990). Physical chemical description of bacterial adhesion. *Journal of Biomaterials Applications*, 5(2), 91–106. doi:10.1177/088532829000500202
- Van Niel, E. W. J., Hofvendahl, K., & Hahn-Hagerdal, B. (2002). Formation and conversion of oxygen metabolites by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 19435 under different growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4350–4356. doi:10.1128/AEM.68.9.4350-4356.2002
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., & Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66–74. doi:10.1126/science.1093857
- Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2008). Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1409–1418. doi:10.1093/jxb/ern048
- Von Canstein, H., Ogawa, J., Shimizu, S., & Lloyd, J. R. (2008). Secretion of flavins by *Shewanella* species and their role in extracellular electron transfer. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 615–623. doi:10.1128/AEM.01387-07

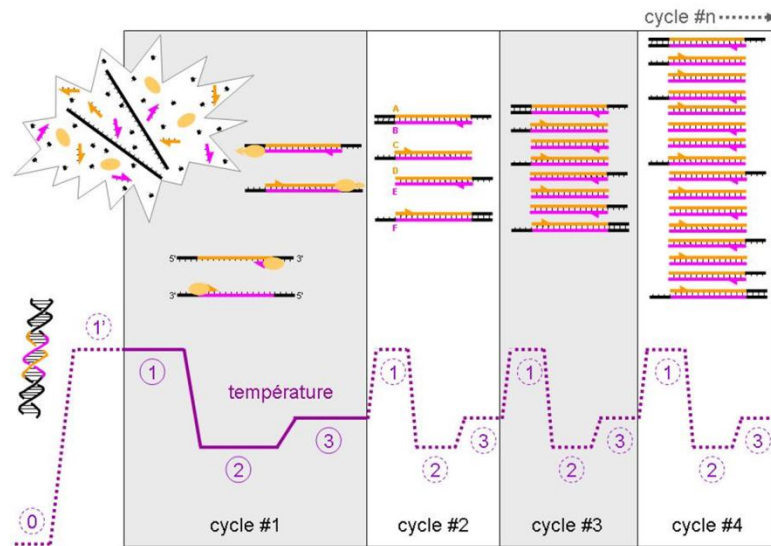
- Wang, H., Jiang, S. C., Wang, Y., & Xiao, B. (2013). Substrate removal and electricity generation in a membrane-less microbial fuel cell for biological treatment of wastewater. *Bioresource Technology*, 138, 109–116. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.172
- Wang, H., & Ren, Z. J. (2013). A comprehensive review of microbial electrochemical systems as a platform technology. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1796–1807. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.10.001
- Wang, Y.-P., Liu, X.-W., Li, W.-W., Li, F., Wang, Y.-K., Sheng, G.-P., & Yu, H.-Q. (2012). A microbial fuel cell-membrane bioreactor integrated system for cost-effective wastewater treatment. *Applied Energy*, 98, 230–235. doi:10.1016/j.apenergy.2012.03.029
- Weissbrodt, D. G., Neu, T. R., Kuhlicke, U., Rappaz, Y., & Holliger, C. (2013). Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 4, 175. doi:10.3389/fmicb.2013.00175
- Whitehead, K. A., Colligon, J., & Verran, J. (2005). Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 41(2-3), 129–138. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.10.010
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578
- Wilson, G. S., Raftos, D. A., Corrigan, S. L., & Nair, S. V. (2010). Diversity and antimicrobial activities of surface-attached marine bacteria from Sydney Harbour, Australia. *Microbiological Research*, 165(4), 300–311. doi:10.1016/j.micres.2009.05.007
- Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., Regan, J. M., & Logan, B. E. (2008). Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1. *Environmental Science & Technology*, 42(11), 4146–4151. doi:10.1021/es800312v
- Yamazaki, S., Kaneko, T., Taketomo, N., Kano, K., & Ikeda, T. (2002). Glucose metabolism of lactic acid bacteria changed by quinone-mediated extracellular electron transfer. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66(10), 2100–2106.
- Yang, Y., Xu, M., Guo, J., & Sun, G. (2012). Bacterial extracellular electron transfer in bioelectrochemical systems. *Process Biochemistry*, 47(12), 1707–1714. doi:10.1016/j.procbio.2012.07.032
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Jung, S. Y., Lee, C. H., & Oh, T. K. (2005). *Algoriphagus yeomjeoni* sp nov., isolated from a marine solar saltern in the Yellow Sea, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 865–870. doi:10.1099/ijs.0.63479-0

- Yooseph, S., Nealson, K. H., Rusch, D. B., McCrow, J. P., Dupont, C. L., Kim, M., & Venter, J. C. (2010). Genomic and functional adaptation in surface ocean planktonic prokaryotes. *Nature*, 468(7320), 60–+. doi:10.1038/nature09530
- Yooseph, S., Sutton, G., Rusch, D. B., Halpern, A. L., Williamson, S. J., Remington, K., & Venter, J. C. (2007). The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Expanding the universe of protein families. *Plos Biology*, 5(3), 432–466. doi:10.1371/journal.pbio.0050016
- You, S.-J., Ren, N.-Q., Zhao, Q.-L., Wang, J.-Y., & Yang, F.-L. (2009). Power Generation and Electrochemical Analysis of Biocathode Microbial Fuel Cell Using Graphite Fibre Brush as Cathode Material. *Fuel Cells*, 9(5), 588–596. doi:10.1002/fuce.200900023
- Zhang, G., Zhao, Q., Jiao, Y., Zhang, J., Jiang, J., Ren, N., & Kim, B. H. (2011). Improved performance of microbial fuel cell using combination biocathode of graphite fiber brush and graphite granules. *Journal of Power Sources*, 196(15), 6036–6041. doi:10.1016/j.jpowsour.2011.03.096
- Zhang, J., Zhang, E., Scott, K., & Burgess, J. G. (2012). Enhanced Electricity Production by Use of Reconstituted Artificial Consortia of Estuarine Bacteria Grown as Biofilms. *Environmental Science & Technology*, 46(5), 2984–2992. doi:10.1021/es2020007
- Zhang, L., Zhou, S., Zhuang, L., Li, W., Zhang, J., Lu, N., & Deng, L. (2008). Microbial fuel cell based on *Klebsiella pneumoniae* biofilm. *Electrochemistry Communications*, 10(10), 1641–1643. doi:10.1016/j.elecom.2008.08.030
- Zhang, T., Cui, C., Chen, S., Yang, H., & Shen, P. (2008). The direct electrocatalysis of *Escherichia coli* through electroactivated excretion in microbial fuel cell. *Electrochemistry Communications*, 10(2), 293–297. doi:10.1016/j.elecom.2007.12.009
- Zhu, G., Onodera, T., Tandukar, M., & Pavlostathis, S. G. (2013). Simultaneous carbon removal, denitrification and power generation in a membrane-less microbial fuel cell. *Bioresource Technology*, 146, 1–6. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.032
- Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, 102(3), 759–781. doi:10.1021/cr010142r
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L. A., Fuhrman, J. A., Horner-Devine, M. C., Huse, S. M., Welch, D. B. M., & Ramette, A. (2011). Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems. *Plos One*, 6(9), e24570. doi:10.1371/journal.pone.0024570
- Zobell, C. E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), 39–56.

Annexes

Annexe 1 : La PCR

Chaque cycle contient les étapes détaillées ci-dessous :



- Conditions natives (0 sur le schéma)

Cette étape se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice.

- Dénaturation initiale (1' sur le schéma)

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage est réalisée. Cette étape permet surtout de déshybrider les ADN double brin.

- Phase de dénaturation (1 sur le schéma)

Cette étape permet de déshybrider les ADN, de « décrocher » les polymérase qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

- Phase d'hybridation (2 sur le schéma)

Cette étape permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Les amorces utilisées sont des amorces d'amplification pour le 16S.

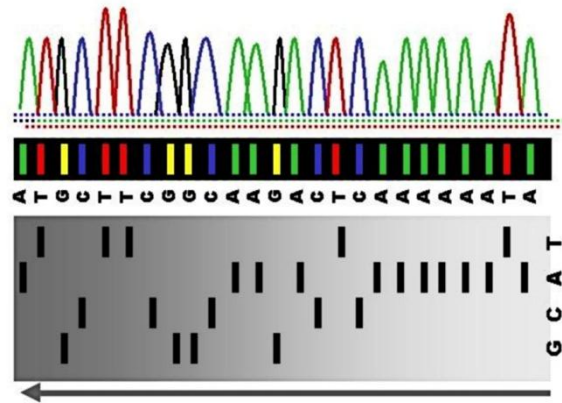
- Phase d'élongation (3 sur le schéma)

Cette étape permet aux polymérase de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale.

La PCR se termine avec une dernière opération, la phase d'élongation finale.

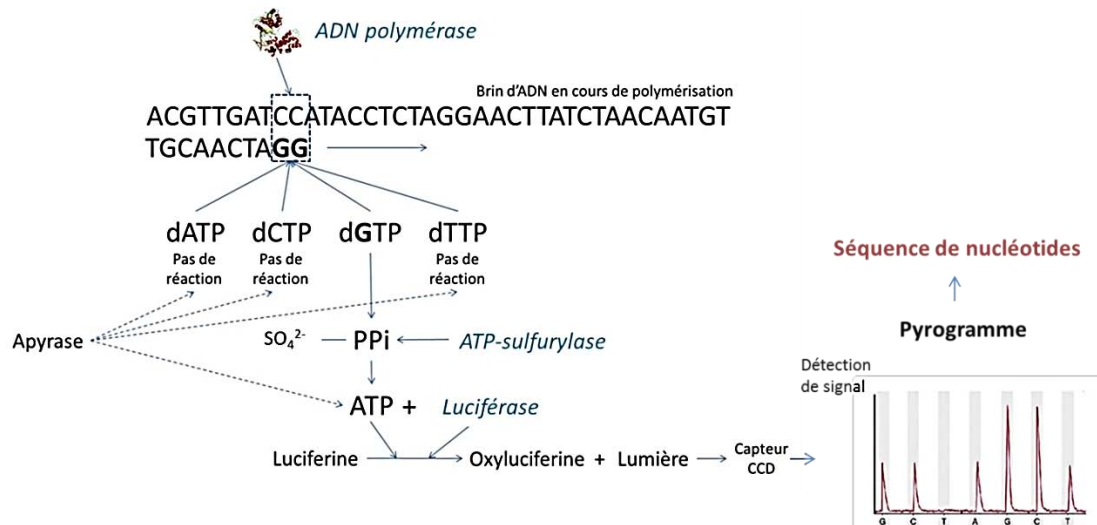
Annexe 2 : Séquençage par la méthode de Sanger

Les nucléotides au sein des acides nucléiques sont liés par une liaison phosphodiester qui s'établit entre le groupement OH sur le carbone 3' du ribose du nucléotide dit en position 5' et le phosphore du groupe phosphoryle en position α du nucléotide dit en position 3'. La méthode de séquençage de Sanger (dite par terminaison de chaîne) utilise des nucléotides appelés didésoxyribonucléotides (ddNTP) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose. Ils peuvent donc être incorporés dans un brin d'ADN en cours de synthèse, mais ils ne permettent pas qu'un autre nucléotide soit incorporé après eux : en effet, l'absence de l'atome d'oxygène en 3' empêche la formation d'une nouvelle liaison phosphodiester. L'allongement du brin d'ADN s'arrête donc au niveau du ddNTP incorporé, d'où terminaison de la synthèse de l'ADN. La polymérase nécessitant un court fragment complémentaire du brin à séquencer pour initier la synthèse du brin copie, la méthode de séquençage de Sanger utilisait une amorce marquée. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN, on répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre didésoxyribonucléotides différents. Il en résulte un mélange de fragments d'ADN. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, ce qui permet ainsi de repérer la position des différents nucléotides dans la séquence :

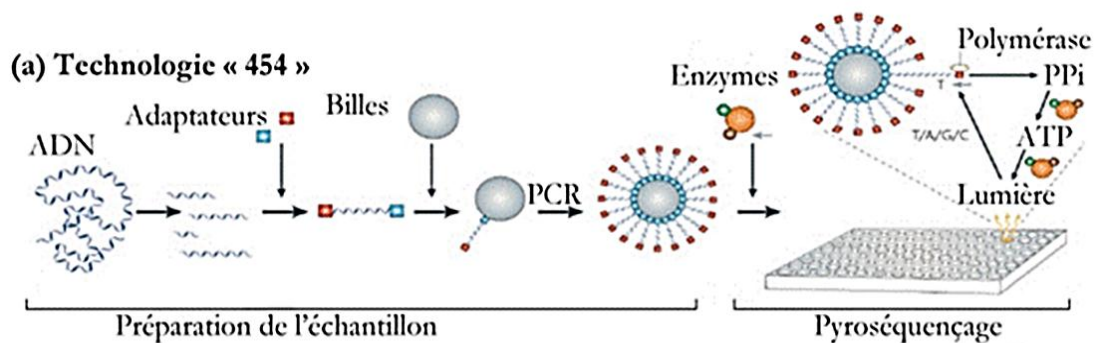


Annexe 3 : Pyroséquençage

Le pyroséquençage fut créé en 1988 par Hyman. Le principe du pyroséquençage par rapport à celui de la technique de Sanger, se base sur l'addition d'un seul nucléotide qui est révélé en temps réel par détection de la luminescence.



Les nucléotides (sous forme de dNTP) sont ajoutés l'un après l'autre et non pas tous ensemble (comme dans la méthode de Sanger). Si le nucléotide ajouté dans le milieu de réaction correspond à celui attendu par l'ADN polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (d'élargissement) et libère un PyroPhosphate inorganique (anion PPi). Une ATP sulfurylase, une enzyme, vient alors transformer ce PPi en adénosine triphosphate (molécule ATP). L'ATP formé est utilisé par une enzyme, la luciférase, qui transforme la luciférine, une molécule, en oxyluciférine, sa forme oxydée, générant un signal lumineux dans le visible proportionnel à la quantité d'ATP. L'apyrase, une enzyme, dégrade les nucléotides non incorporés et l'excès d'ATP. Le séquenceur, précisément le capteur CDD (Charged-Coupled Device) capte le signal lumineux et le traduit par un pic sur le pyrogramme. La hauteur du pic est proportionnelle à l'intensité du signal lumineux. On déduit la séquence à partir de la taille des pics obtenus. La technologie 454 est une technique de séquençage caractérisée par la mise en œuvre de la nanotechnologie. Elle est basée sur l'amplification d'ADN lié à une bille en émulsion, ADN qui subit ensuite un pyroséquençage. Lors de la synthèse d'un nouveau brin d'ADN, la fluorescence portée par le nouveau nucléotide est lue. Cette technique ne nécessite pas de clonage (donc gain de temps et d'argent), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage.



Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN génomique avec le kit UltraClean Soil.

Préparation de l'échantillon & Lyse cellulaire



- Ajouter 250 mg de l'échantillon dans le tube UltraClean
- Ajouter 60 μ L de solution S1
- Ajouter 200 μ L de solution IRS
- Vortexer pendant 10 minutes



Centrifuger à 10 000g pendant 30 secondes

Liaison à l'ADN



- Transférer le surnageant dans un nouveau tube UltraClean
- Ajouter 250 μ L de solution S2
- Vortexer 5 secondes
- Incuber 5 minutes à 4°C



Centrifuger à 10 000g pendant 1 minute



- Transférer 450 μ L de surnageant dans un nouveau tube UltraClean
- Ajouter 900 μ L de solution S3
- Vortexer 5 secondes



*Transférer 600 μ L dans une colonne (Spin Filter)
Centrifuger à 10 000g pendant 1 minute*

Lavage



- Eliminer le filtrat, transférer la colonne sur un tube UltraClean propre
- Ajouter 300 μ L de solution S4 dans la colonne












*Centrifuger à 10 000g pendant 30 secondes
Eliminer le filtrat, transférer la colonne sur un tube UltraClean propre
Centrifuger à 10 000g pendant 1 minute et 30 secondes*

Elution



- Eliminer le filtrat, transférer la colonne sur un tube UltraClean propre
- Ajouter 50 μ L de solution S5 au centre de la colonne
- Incuber 5 minutes à température ambiante
- Centrifuger à 10 000g pendant 30 secondes
- Récupérer la solution d'ADN (50 μ L) et jeter la colonne
- Placer rapidement l'échantillon à - 20°C (longue conservation) ou à 4°C (utilisation dans les 24 heures),

Annexe 5 : Protocole d'extraction d'ADN plasmidique avec le kit Invitrogen PureLink.

	1. Récolte. Centrifuger 2 mL d'une culture de <i>Lactococcus lactis</i> (1 à 2.10 ⁹ cellules). Oter le surnageant.
	2. Resuspension. Ajouter 250 µL du tampon R3, homogénéiser.
	3. Lyse. Ajouter 250 µL du tampon de lyse L7, homogénéiser. Incuber 5 minutes à température ambiante
	4. Précipitation. Ajouter 350 µL du tampon de précipitation N4, homogénéiser. Centrifuger à 12 000g minimum pendant 10 minutes
	5. Adsorption. Transférer le surnageant dans une colonne placée dans un tube de 2mL. Centrifuger à 12 000g pendant 1 minute. Placer la colonne sur un nouveau tube.
	6. Lavage. Ajouter 500 µL du tampon de lavage W10 dans la colonne. Incuber 1 minute à température ambiante, Centrifuger à 12 000g pendant 1 minute. Placer la colonne sur un nouveau tube.
	7. Lavage. Ajouter 700 µL du tampon de lavage W9 dans la colonne. (Centrifuger à 12 000g pendant 1 minute. Placer la colonne sur un nouveau tube.) x2
	8. Elution. Placer la colonne dans un tube de 1,5 mL. Ajouter 75 µL de tampon TE au centre de la colonne. Incuber 1 minute à température ambiante.
	9. Récupération. Centrifuger à 12 000g pendant 2 minutes. Le tube de 1,5 mL contient l'ADN. Stocker l'échantillon à – 20°C (longue conservation) ou à 4°C (utilisation dans les 24 heures).

Annexe 6 : Protocole d'extraction d'ADN plasmidique MiniPreps Rapide.

1. **Récolte.** Centrifuger 2 mL d'une culture de *Lactococcus lactis* (1 à 2.10⁹ cellules) à 13 000 rpm pendant 3 minutes et à 4°C.
2. **Resuspension.** Ajouter 1 mL du tampon TES. Incuber 1 heure à 37°C.
3. **Lyse.** Ajouter 200 µL d'une solution de NaOH 0,2 N et SDS 1 %, homogénéiser.
4. **Précipitation.** Ajouter 200 µL de chloroforme, incuber 1 minute à température ambiante et homogénéiser. Ajouter 150 µL d'acétate de potassium 3M pH 4,8 et homogénéiser. Centrifuger à 13 000g pendant 5 minutes et à 4°C.
5. **Adsorption.** Transférer le surnageant (500 µl) dans un nouveau tube. Ajouter 50 µL d'acétate de sodium 3M pH 7 et 1 volume d'isopropanol froid. Centrifuger à 13 000 rpm pendant 15 minutes et à 4°C.
6. **Lavage. x2** Ajouter 1 mL d'éthanol 70 %. Centrifuger à 13 000 rpm pendant 10 minutes.
7. **Récupération.** Sécher le culot 20 minutes sous hotte. Stocker l'échantillon à – 20°C (longue conservation) ou à 4°C (utilisation dans les 24 heures).

Annexe 7 : Tableau regroupant l'analyse du pyroséquençage (les données sont en %).

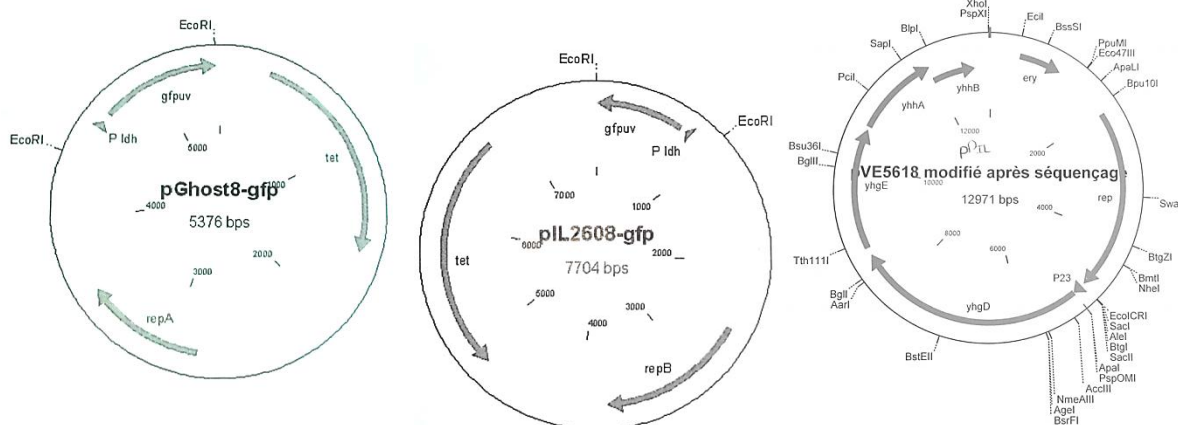
Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Especie	
Bacteroidetes (21,261)	Bacteroidia (0,117)	Bacteroidales (0,117)	Bacteroidaceae (0,117)	<i>Bacteroides</i> (0,117)	<i>Bacteroides</i> sp (0,117302)	
	Cytophagia (0,205)	Cytophagales (0,205)	Cyclobacteriaceae (0,015)	<i>Cyclobacterium</i> (0,015)	<i>Cyclobacterium marinum</i> (0,014663)	
			Cytophagaceae (0,015)	<i>Flexibacter</i> (0,015)	<i>Flexibacter</i> sp (0,014663)	
			Flammeovirgaceae (0,176)	<i>Flexithrix</i> (0,176)	<i>Flexithrix dorotheae</i> (0,175953)	
	Flavobacteriia (20,938)	Flavobacteriales (20,938)	Flavobacteriaceae (20,938)	<i>Cellulophaga</i> (1,716)	<i>Cellulophaga lytica</i> (1,671554)	
				<i>Cellulophaga</i> sp (0,043988)	<i>Cellulophaga</i> sp (0,043988)	
				<i>Flavobacterium</i> (0,059)	<i>Flavobacterium</i> sp (0,058651)	
				<i>Formosa</i> (2,302)	<i>Formosa</i> sp (2,302053)	
				<i>Maribacter</i> (0,132)	<i>Maribacter</i> sp (0,131965)	
				<i>Polaribacter</i> (16,598)	<i>Polaribacter</i> sp (16,598240)	
				<i>Salagentibacter</i> (0,015)	<i>Salagentibacter</i> sp (0,014663)	
				<i>Tenacibaculum</i> (0,117)	<i>Tenacibaculum maritimum</i> (0,087977)	
Alphaproteobacteria (7,683)	Rhizobiales (0,176)	Bradyrhizobiaceae (0,059)	<i>Rhodopseudomonas</i> (0,059)	<i>Rhodopseudomonas</i> sp (0,058651)		
			<i>Devosia</i> (0,029)	<i>Devosia subaequoris</i> (0,029325)		
			<i>Chelativorans</i> (0,029)	<i>Chelativorans multitrophicus</i> (0,029325)		
			<i>Ajifella</i> (0,044)	<i>Ajifella marina</i> (0,043988)		
			<i>Labrys</i> (0,015)	<i>Labrys methylaminiphilus</i> (0,014663)		
			<i>Hyphomonadaceae</i> (0,073)	<i>Hyphomonas</i> (0,073)	<i>Hyphomonas oceanitis</i> (0,029325)	
		Rhodobacteraceae (7,112)	<i>Jannaschia</i> (0,630)	<i>Jannaschia helgolandensis</i> (0,469208)		
			<i>Jannaschia</i> rubra (0,161290)	<i>Jannaschia</i> sp (0,161290)		
			<i>Loktanella</i> (0,440)	<i>Loktanella</i> sp (0,439882)		
			<i>Octadecabacter</i> (0,044)	<i>Octadecabacter</i> sp (0,043988)		
	<i>Phaeobacter</i> (0,073)		<i>Phaeobacter arcticus</i> (0,043988)			
	<i>Phaeobacter</i> sp (0,029325)		<i>Phaeobacter</i> sp (0,029325)			
	<i>Rhodobacter</i> (0,015)		<i>Rhodobacter</i> sp (0,014662)			
	<i>Roseobacter</i> (1,539)		<i>Roseobacter denitrificans</i> (0,293255)			
	<i>Roseobacter</i> sp (1,246334)		<i>Roseobacter</i> sp (1,246334)			
	<i>Roseovarius aestuarii</i> (0,073313)		<i>Roseovarius</i> sp (0,117302)			
	<i>Roseovarius</i> (0,190)		<i>Roseovarius</i> sp (0,117302)			
	<i>Sulfitobacter</i> (4,092)		<i>Sulfitobacter brevis</i> (0,014662)			
	<i>Sulfitobacter japonica</i> (0,058651)		<i>Sulfitobacter japonica</i> (0,058651)			
	<i>Sulfitobacter pontiacus</i> (0,703812)		<i>Sulfitobacter</i> sp (3,313782)			
	<i>Sulfitobacter</i> sp (3,313782)		<i>Sulfitobacter</i> sp (3,313782)			
	<i>Tateyamaria</i> (0,015)		<i>Tateyamaria</i> sp (0,014662)			
	<i>Thalassobacter</i> (0,044)	<i>Thalassobacter</i> sp (0,043988)				
	<i>Thalassobius</i> (0,030)	<i>Thalassobius aestuarii</i> (0,014662)				
	<i>Thalassobius</i> sp (0,014662)	<i>Thalassobius</i> sp (0,014662)				
	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae (0,059)	<i>Nisaea</i> (0,059)	<i>Nisaea denitrificans</i> (0,058651)		
	Sphingomonadales (0,264)	Erythrobacteraceae (0,074)	<i>Erythrobacter</i> (0,074)	<i>Erythrobacter litoralis</i> (0,014662)		
		Sphingomonadaceae (0,191)	<i>Sphingobium</i> (0,059)	<i>Sphingobium</i> sp (0,058651)		
	Proteobacteria (78,739)	Betaproteobacteria (0,029)	Burkholderiales (0,029)	Burkholderiaceae (0,029)	<i>Burkholderia</i> (0,029)	<i>Burkholderia anthina</i> (0,014662)
					<i>Burkholderia</i> sp (0,014662)	<i>Burkholderia</i> sp (0,014662)
		Gammaproteobacteria (71,026)	Alteromonadales (5,572)	Alteromonadaceae (3,431)	<i>Glaciecola</i> (0,293)	<i>Glaciecola</i> sp (0,293255)
					<i>Haliae</i> (0,015)	<i>Haliae</i> rubra (0,014662)
<i>Marinobacter</i> (2,669)					<i>Marinobacter flavimaris</i> (0,014662)	
<i>Marinobacter</i> hydrocarbonoclasticus (0,014662)					<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (0,014662)	
<i>Marinobacter lacsalsi</i> (0,029325)					<i>Marinobacter lacsalsi</i> (0,029325)	
<i>Marinobacter lutaoensis</i> (0,029325)					<i>Marinobacter</i> sp (2,580645)	
<i>Marinobacter</i> sp (2,580645)					<i>Marinobacter</i> sp (2,580645)	
<i>Marinobacterium</i> (0,073)					<i>Marinobacterium</i> sp (0,073313)	
<i>Microbulbifer</i> (0,381)					<i>Microbulbifer cystodytense</i> (0,117302)	
<i>Microbulbifer</i> sp (0,263929)					<i>Microbulbifer</i> sp (0,263929)	
Colwelliaceae (1,789)			<i>Colwellia</i> (1,789)	<i>Colwellia psychrerythraea</i> (0,014662)		
Ferrimonadaceae (0,015)			<i>Colwellia</i> sp (1,774193)	<i>Colwellia</i> sp (1,774193)		
Pseudoalteromonadaceae (0,323)			<i>Paraferrimonas</i> (0,015)	<i>Paraferrimonas sedimenticola</i> (0,014662)		
Shewanellaceae (0,015)			<i>Pseudoalteromonas</i> (0,323)	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> (0,087976)		
<i>Pseudoalteromonas</i> sp (0,234604)			<i>Pseudoalteromonas</i> sp (0,234604)			
<i>Shewanella</i> (0,015)			<i>Shewanella livingstonensis</i> (0,014662)			
Chromatiales (29,311)		Ecotiorhodospiraceae (29,311)	<i>Alkalispirillum</i> (0,015)	<i>Alkalispirillum mobile</i> (0,014662)		
Gammaproteobacteria (0,499)		Gammaproteobacteria (0,499)	<i>Thiorhodospira</i> (29,296)	<i>Thiorhodospira</i> sp (29,296187)		
			<i>Marinicella</i> (0,044)	<i>Marinicella litoralis</i> (0,043988)		
			<i>Spongiibacter</i> (0,279)	<i>Spongiibacter</i> sp (0,278592)		
Legionellales (0,015)		Coxiellaceae (0,015)	<i>Thiobios</i> (0,176)	<i>Thiobios zoothamnicoli</i> (0,175953)		
			<i>Coxiella</i> (0,015)	<i>Coxiella</i> sp (0,014662)		
Oceanospirillales (3,724)		Alcanivoracaceae (2,977)	Alcanivoracaceae (2,977)	<i>Alcanivorax</i> (2,977)	<i>Alcanivorax borkumensis</i> (0,029325)	
				<i>Alcanivorax</i> hongdengensis (0,014662)	<i>Alcanivorax</i> hongdengensis (0,014662)	
				<i>Alcanivorax</i> sp (0,366568)	<i>Alcanivorax</i> sp (0,366568)	
				<i>Alcanivorax venustensis</i> (2,565982)	<i>Alcanivorax venustensis</i> (2,565982)	
				<i>Halomonas</i> campisalis (0,117302)	<i>Halomonas campisalis</i> (0,117302)	
		Halomonadaceae (0,543)	Halomonadaceae (0,543)	<i>Halomonas</i> cupida (0,014662)	<i>Halomonas cupida</i> (0,014662)	
				<i>Halomonas</i> sp (0,366568)	<i>Halomonas</i> sp (0,366568)	
				<i>Halomonas venusta</i> (0,043988)	<i>Halomonas venusta</i> (0,043988)	
	Oceanospirillaceae (0,205)	Oceanospirillaceae (0,205)	<i>Marinomonas</i> (0,205)	<i>Marinomonas arenicola</i> (0,014662)		
			<i>Marinomonas</i> mediterranea (0,161290)	<i>Marinomonas mediterranea</i> (0,161290)		
Pseudomonadales (0,073)	Moraxellaceae (0,029)	Moraxellaceae (0,029)	<i>Marinomonas</i> vaga (0,029325)	<i>Marinomonas vaga</i> (0,029325)		
			<i>Acinetobacter</i> (0,029)	<i>Acinetobacter</i> sp (0,029325)		
			<i>Pseudomonas</i> (0,044)	<i>Pseudomonas</i> sp (0,043988)		
Thiotrichales (31,833)	Piscirickettsiaceae (6,452)	Piscirickettsiaceae (6,452)	<i>Cyclocasticus</i> (6,452)	<i>Cyclocasticus spirillensis</i> (0,043988)		
			<i>Cyclocasticus</i> spirillensis (0,043988)	<i>Cyclocasticus</i> spirillensis (0,043988)		
			<i>Thiothrix</i> (25,381)	<i>Thiothrix</i> sp (25,381231)		

Annexe 8 : Préparation de la digestion plasmidique sur les plasmides extraits des souches VE 17228, VE 1729 et VE 17231

	M	17228			17229			17231		
(μ L)		nd	d	d	nd	d	d	nd	d	d
Plasmide		8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5
EcoRI		-	0,5	0,5	-	0,5	0,5	-	0,5	0,5
Tampon		1								
Eau		0,5	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-
V _{finale}		10								
Bleu ARNase		Digestion 1h 37°C Puis 2 μ L – 15 minutes d'action à 37 °C								

M : Marqueur de taille
nd : plasmide non digéré
d : plasmide digéré

Annexe 9 : Schéma des plasmides pGhost8-gfp, pIL2608-gfp et pMV518gfp



Annexe 10 : Préparation de la digestion plasmidique sur les plasmides extraits des transformants Δ8, Δ9, +8 et +9.

(μL)	M	Δ8(1)	Δ8(1)	Δ8(2)	M	Δ9(1)	Δ9(1)	Δ9(1)	Δ9(2)	Δ9(3)	+8(1)	+8(2)	+8(1)	+8(1)	+8(2)
α	nd	α	α	α	α	nd	α	α	α	α	nd	α	α	α	α
EcoRI		0,5	0,5	0,5											
XhoI		-	-	-											
Tp		1	1	1											
EcoRI		-	-	-											
Tp		-	-	-											
XhoI		-	-	-											
BSA		-	-	-											
1/10		2,5	2,5	2,5											
Eau		4	6	6											
Plasmide		6	6	6											
V _{final}															
Bleu															
ARNase															
Digestion 45 minutes à 37°C - 2 μL action 10 minutes à 37°C															
(μL)	M	+9(1)	+9(2)	+9(3)	M	+9(1)	+9(2)	+9(3)	+9(1)	+9(2)	+9(3)	+9(1)	+9(2)	+9(3)	+9(3)
α	nd	α	α	α	α	nd	α	α	α	α	α	α	α	α	α
XhoI		0,5	0,5	0,5											
Tp		-	-	-											
XhoI		1	1	1											
BSA 1/10		1	1	1											
Eau		4	1,5	1,5											
Plasmide		6	6	6											
V _{final}															
Bleu															
ARNase															
Digestion 45 minutes à 37°C - 2 μL action 10 minutes à 37°C															

M : Marqueur de taille
nd : plasmide non digéré
d : plasmide digéré

Annexe 11 : Préparation de la microplaque utilisée pour l'étude de la colonisation de *Lactococcus lactis* en présence de différentes concentrations en MOPS, en NaCl et en hémine.

- Le milieu M17 glucose (0,5 %) a été réalisé à partir d'une solution de glucose à 50 % soit respectivement 1.5 μL dans 148,5 μL de milieu M17.
- Une solution d'hémine à 0,5 mg.mL^{-1} a été préparée soit 30 mg d'hémine dans 60 mL NaOH 0,05 N (600 μL NaOH 5 N dans 60 mL eau distillée) puis filtrée (0,2 μm). Trois concentrations d'hémine seront réalisées dans un volume final de 1 mL de milieu M17 glucose :
 - 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ soit 10 μL de la solution mère dans 990 μL : solution 1.
 - 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ soit 20 μL de la solution mère dans 980 μL : solution 2.
 - 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ soit 40 μL de la solution mère dans 960 μL : solution 3.
- Une solution de NaCl à 30% a également été réalisée soit 290 g.L-1. Cinq concentrations de sel vont être préparées dans un volume final de 150 μL de milieu M17 glucose dans les puits:
 - 1 % (9,6 g.L-1) soit 5 μL de la solution mère dans 145 μL .
 - 2 % (19,3 g.L-1) soit 10 μL de la solution mère dans 140 μL .
 - 3 % (29,0 g.L-1) soit 15 μL de la solution mère dans 135 μL .
 - 4 % (38,6 g.L-1) soit 20 μL de la solution mère dans 130 μL .
 - 5 % (48,3 g.L-1) soit 25 μL de la solution mère dans 125 μL .
- Une solution de MOPS a une concentration de 400 g.mL-1 a été réalisée soit 4 g dans 10 mL d'eau distillée. Le pH de la solution a été ajusté à 6,8 puis celle-ci a été filtrée (0,2 μm). Dans les puits, sa concentration finale était de 200 mmol.L^{-1} soit 15 μL de la solution mère dans 135 μL .

Le plan de la microplaque est présenté ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Hémine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobiose 147 μL solution 1			Hémine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobiose 147 μL solution 1			Hémine 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobiose 147 μL solution 2			Hémine 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobiose 147 μL solution 2		
B	Hémine 20$\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobiose 147 μL solution 3			Hémine 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobiose 147 μL solution 3								
C	NaCl 1% : 5 μL NaCl 5 N 142 μL M17 Glc			NaCl 2% : 10 μL NaCl 5 N 137 μL M17 Glc			NaCl 3% : 15 μL NaCl 5 N 132 μL M17 Glc			NaCl 4% : 20 μL NaCl 5 N 127 μL M17 Glc		
D	NaCl 5% : 25 μL NaCl 5 N 122 μL M17 Glc											
E	Glucose 0,5 % 147 μL			Glucose 1 % 3 μL solution glucose 50% 129 μL M17 MOPS 15 μL								

Tous les puits ont reçus 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'érythromycine car la souche utilisée pour ce test est la souche VE 17173 (« pil + ») contenant le plasmide pIL porteur d'un gène de résistance à cet antibiotique.

Annexe 12 : Liste de données permettant d'obtenir la moyenne du biovolume et de l'épaisseur des biofilms obtenus avec *Lactococcus lactis* dans différentes conditions expérimentales.

Glc 0,5 %	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	3237714,6	2253506,91	3608247,42	3033156,31
Thickness [μm]	48,308648	71,012723	68,906957	62,742776
Glc 1 % MOPS	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	3101974,64	3147194,5	2860850,73	3036673,29
Thickness [μm]	24,930056	23,690247	26,902706	25,174336
NaCl 1 %	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	3274684,03	1056850,39	2874264,52	2401932,98
Thickness [μm]	23,10183	35,078285	27,682435	28,62085
NaCl 2 %	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	2436903,66	2555839,77	2735453,11	2576065,51
Thickness [μm]	20,036937	20,604167	19,732045	20,124383
NaCl 3 %	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	1289576,28	1233505,97	1326835,49	1283305,91
Thickness [μm]	49,681327	14,744023	16,516437	26,980595
NaCl 4 %	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	1606195,84	2282957,04	2263173,01	2050775,3
Thickness [μm]	44,791153	18,806672	33,047483	32,215103
NaCl 5 %	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	1212656,66	878553,685	232946,187	774718,843
Thickness [μm]	11,869561	20,629304	11,0084	14,502422

Hémine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobie	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	4205425,59	3171909,77	2049410,4	3142248,58
Thickness [μm]	77,872671	50,138784	64,751646	64,254367
Hémine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobie	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	3682597,05			3682597,05
Thickness [μm]	48,510247			48,510247
Hémine 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobie	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	2755157,67	1381308,94	3232477,47	2456314,69
Thickness [μm]	46,296319	24,097277	44,442347	38,278648
Hémine 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobie	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	2822820,47	3026281,39		2924550,93
Thickness [μm]	60,508143	35,917629		48,212886
Hémine 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobie	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	3317742,18	2578820,72	563291,122	2153284,67
Thickness [μm]	59,800036	66,305074	17,482111	47,862407
Hémine 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobie	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Moyenne
Biovolume [μm^3]	2258440,44	3023517,23		2640978,84
Thickness [μm]	56,530876	49,230815		52,880846

	Biovolume [μm^3]	Thickness [μm]
GLC 0,5 %	3033156,3	62,742776
Glc 1 % MOPS	3036673,3	25,174336
NaCl 1 %	2401933	28,62085
NaCl 2 %	2576065,5	20,124383
NaCl 3 %	1283305,9	26,980595
NaCl 4 %	2050775,3	32,215103
NaCl 5 %	774718,84	14,502422
Hémine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobie	3142248,6	64,254367
Hémine 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobie	3682597,1	48,510247
Hémine 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobie	2456314,7	38,278648
Hémine 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobie	2924550,9	48,212886
Hémine 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Aérobie	2153284,7	47,862407
Hémine 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ Anaérobie	2640978,8	52,880846

Annexe 13 : Préparation de la microplaque utilisée pour l'étude de la colonisation de *Lactococcus lactis*, transformants « pil- » vs transformants « pil + ».

Une préculture de chaque transformant a été réalisée en tube à essai stériles :

	$\Delta 8$	+8	$\Delta 9$	+9	$\Delta 31$	+31
M17	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Glucose	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Erythromycine (25 mg.mL ⁻¹)	-	1 μ L	-	1 μ L	-	1 μ L
Tétracycline (5 mg.mL ⁻¹)	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L	5 μ L
Inoculum	1 colonie					

Incubation à 30°C pendant 6-7 heures.

Microplaque Ligne G	$\Delta 8$	+8	$\Delta 9$	+9	$\Delta 31$	+31
M17 Glucose 0,5 % Tétracycline (5 μ g.mL ⁻¹)	150 μ L	-	150 μ L	-	150 μ L	-
M17 Glucose 0,5 % Tétracycline (5 μ g.mL ⁻¹) Erythromycine (5 μ g.mL ⁻¹)	-	150 μ L	-	150 μ L	-	150 μ L
Inoculum	1 oese des précultures					

Incubation une nuit à 30°C.

RÉSUMÉ

Depuis 2002 a émergé le concept de « catalyse électromicrobienne ». Cette même année, une équipe du LGC a démontré un phénomène de transfert d'électrons entre un biofilm aérobie marin et une cathode d'acier inoxydable. A partir de ces biofilms a été isolée une souche bactérienne, *Algoriphagus yeomjeoni*, pouvant former un biofilm électroactif monoespèce.

Les objectifs de ce travail ont été de rechercher cette capacité à réduire du dioxygène chez des bactéries marines mais également chez une souche issue de l'industrie agroalimentaire *Lactococcus lactis*.

La première partie de cette étude porte sur l'étude d'*Algoriphagus yeomjeoni*. Les essais électrochimiques ont eu lieu en eau de mer synthétique, dont on contrôle la composition. Aucune production de courant n'a pu être détectée même en repassant en eau de mer naturelle. La perte d'électroactivité de cette souche nous a amené à la deuxième partie de ce travail qui a été la recherche de nouveaux isolats bactériens électroactifs à partir d'un biofilm formé en milieu marin. La population microbienne de ce biofilm a été étudiée par pyroséquençage. Puis, quatre souches bactériennes ont pu être isolées et identifiées. Ces souches appartenant au genre *Bacillus*, *Roseobacter*, *Pseudoalteromonas* et *Marinobacter* ont toutes présentées des capacités de réduction du dioxygène à la cathode aussi bien en eau de mer naturelle qu'eau de mer synthétique. Enfin, des essais électrochimiques ont été réalisés avec *Lactococcus lactis*. Cette souche a présenté des capacités électrochimiques dans un compartiment anodique avec un record de performance de 400 mA.m⁻². Et, pour la première fois, *Lactococcus lactis* a été capable de catalyser une réduction impliquant le dioxygène à une cathode avec une densité de courant maximale de 50 mA.m⁻².

Mots-clés : oxygène, biocathode, biofilm marin, *Lactococcus lactis*

ABSTRACT

Since 2002 emerged the concept of "microbial electro-catalysis". That same year, a team from the Chemical Engineering Laboratory demonstrated a phenomenon of electron transfer between a marine aerobic biofilm and a stainless steel cathode. From these biofilms was isolated a bacterial strain *Algoriphagus yeomjeoni* which form a mono-species electroactive biofilm.

The objectives of this work were to seek the ability to catalyze a reduction of oxygen amongst marine bacteria but also in a strain used in food industry *Lactococcus lactis*.

The first part of this study focuses on the study of *Algoriphagus yeomjeoni*. Electrochemical tests were conduct in synthetic seawater, whose composition is controlled. No power generation could be detected even by returning in natural seawater. The loss of electroactivity of this strain led us to the second part of the work that has been looking for new electroactive bacterial isolates from a biofilm formed in a marine environment. This microbial population in this biofilm was studied by pyrosequencing. Then, four bacterial strains have been isolated and identified. These strains of the genus *Bacillus*, *Roseobacter*, *Pseudoalteromonas* and *Marinobacter* have all shown the ability to reduce the oxygen at the cathode in both natural and synthetic seawater. Finally, electrochemical tests were performed with, *Lactococcus lactis*. This strain showed electrochemical capacity in an anode compartment with a record performance up to 400 mA.m⁻². Furthermore, and for the first time, *Lactococcus lactis* was able to catalyze the oxygen reduction involving a cathode with a maximum current density of 50 mA.m⁻².

Keywords : oxygen, biocathode, marine biofilm, *Lactococcus lactis*